Lane Medical Library

Aus dem Staats-Seruminstitut in Kopenhagen

STANFORD UNIVERSITY LIBRARY OCT 27 1930

Über Carbhämoglobin

Von

O. M. Henriques

Mit 47 Textabbildungen

Sonderdruck aus den Ergebnissen der Physiologie – Band XXVIII
Herausgegeben von L. Asher und K. Spiro

München · Verlag von J. F. Bergmann · 1929

Über Carbhämoglobin

Forsvaret finder Sted Torsdag den 20. Juni 1929, Kl. 2, i Universitetsannekset, Studiestræde 6, o. G.

Aus dem Staats-Seruminstitut in Kopenhagen

Über Carbhämoglobin

Von

O. M. Henriques

Mit 47 Textabbildungen

Sonderdruck aus den Ergebnissen der Physiologie – Band XXVIII
Herausgegeben von L. Asher und K. Spiro

München · Verlag von J. F. Bergmann · 1929

Denne Afhandling er af det matematisk-naturvidenskabelige Fakultet antaget til offentlig at forsvares for den filosofiske Doktorgrad.

København, den 21. Februar 1929.

H. M. Hansen
h. a. dec.

Dette Arbejde er udført paa Statens Seruminstitut i København. Jeg beder Institutets Direktør, Dr. Thorvald Madsen, modtage min varmeste Tak for de Aar, jeg har arbejdet under hans Ledelse, for den venlige og opmuntrende Interesse, hvormed han altid har omfattet mit Arbejde, og for de udmærkede Laboratorieforhold, han har stillet til min Raadighed.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40154811_0004

Dansk Oversigt.

I. Indledning. Der er givet en kort Fremstilling af de hidtidige Grundanskuelser vedrørende Kuldioxydets Tilstandsform i Blodet: man har ment, at Kuldioxydet kun skulde existere som opløst CO_2, hydratiseret CO_2 (H_2CO_3) og Bikarbonat (HCO_3'), at den simple Massevirkningslov skulde være gyldig for Kuldioxydets Dissociation i Blodet, at CO_2-Skiftet til og fra Blodet skulde foregaa gennem Hydratisering af CO_2 resp. Anhydrering af Kulsyre, og at Ionfordelingen mellem Erythrocyter og Plasma skulde kunne forklares som simple fysisk-kemiske Ligevægtsindstillinger.

Af Faurholts Forsøg er beregnet de Hastigheder, med hvilke CO_2-Bikarbonat-Opløsninger kan naa til Ligevægt ved fysiologisk Brintionaktivitet og forskellige Temperaturer. Det er vist, at CO_2-Bikarbonat-Systemet i Blod umuligt kan naa Ligevægten indenfor et Sekund, d. v. s. den Tid Blodet gennemsnitlig bruger til Capillarpassagen. Ved 0°, 18° og 37° C naar kun resp. 0,4%, 3% og 16% af Kulsyrekomponenterne at omsætte sig. Problemstillingen, som disse Overvejelser samt nogle kort berørte Forsøg har givet Anledning til, er fremsat.

II. Nogle Betragtninger over Æggehvidestoffernes almindelige fysiske Kemi i Belysning af Bjerrums Amfolytteori; det fremgaar heraf, at Komplexbinding af Ioner (eller en Luftart som O_2) til Æggehvidemolekyler under samtidig elektrisk Omladning af Æggehvidemolekylerne er et almindeligt Fænomen; den af Forfatteren paaviste Komplexbinding af CO_2 til Hæmoglobin, som er ledsaget af Elektronegativering af Hæmoglobinmolekylerne, kan derfor kun betragtes som et Specialtilfælde.

III. Om „Dissociationen af CO_2". Loven for „Kuldioxydets Dissociation" i vandige Opløsninger er gennemgaaet. Det er vist at Stadie & Hawes (1928) Maalinger af „Kuldioxydets I. Dissociationskonstant" i Hæmoglobinopløsninger kun kan opfattes som en Bekræftelse af Forfatterens Paavisning af Komplexbindingen af CO_2 og Klor til Hæmoglobinet.

IV. Der er givet et kort historisk Tilbageblik over de sidste 30 Aars Arbejder over Hæmoglobinets fysiske Kemi.

V. Tre Donnan-Forsøgsrækker med CO_2-Cl'-Hæmoglobinopløsninger og en med Fosfat-Hæmoglobinopløsning er kort meddelt. Der er paavist en med Brintionaktiviteten varierende Komplexbinding af CO_2, Cl'-og Fosfationer til Hæmoglobinet. For CO_2-Hæmoglobinkomplexet er foreslaaet Navnet Carbhæmoglobin.

VI. Der er refereret en Række „Explosionsanalyser" med 3 forskellige Sera og flere forskellige Hæmoglobinopløsninger, som var mættet ved forskellige CO_2-Tryk. Det er vist at Hæmoglobinopløsninger — men ikke simple CO_2-Bikarbonatopløsninger som Sera — „momentant" kan afgive en Del af deres bundne CO_2, naar de pludselig udsættes for et Torricelli-Vakuum, medens de kun afgiver Resten langsomt, ganske som Sera kun afgiver deres bundne CO_2 langsomt. Det er fremhævet, at det hurtigreagerende CO_2 i CO_2-Hæmoglobinopløsninger efter al Sandsynlighed er komplexbundet til Hæmoglobinet — altsaa som Carbhæmoglobin.

VII. Nogle fysiologiske Betragtninger. Det er paavist, at:

a) I Blodet foregaar Udskiftningen af den kemisk bundne CO_2 udelukkende gennem Carbhæmoglobinet; Bikarbonatet (HCO_3') og Kulsyren (H_2CO_3) spiller samme underordnede Rolle for Respirationen som Klorionerne. Under Capillarpassagen bringes Blodets Bikarbonat- og Klorionsystem til Ligevægt gennem Ionernes Diffusion mellem Plasma og Erytrocyter.

b) Da Saltkoncentrationerne i Plasma og Erytrocyter øver en stor Indflydelse paa Hæmoglobinets Evne til at udskifte O_2 og CO_2, og da man af mange Forsøg fra Literaturen ved, at Bikarbonat hurtigt forsvinder ud af Blodbanen ved forceret Respiration og hurtigt kommer ind i Blodbanen ved Sagtning af Respirationen, saa kan man slutte, at

Organismen er udstyret med en hurtigt virkende, fysisk-kemisk, intrasanguin Reguleringsmekanisme af sit respiratoriske Stofskifte, som indstiller Hæmoglobinets respiratoriske Ydeevne efter det øjeblikkelige Behov.

Aus dem Staats-Seruminstitut in Kopenhagen.

Über Carbhämoglobin.

Von

O. M. Henriques, Kopenhagen.

Mit 47 Abbildungen im Text.

Inhaltsverzeichnis.

Seite

I. Einleitung 1
II. Einige Betrachtungen über die allgemeine physikalische Chemie der Eiweissstoffe 6
III. Über die „Dissoziation des CO_2“ 15
IV. Einige Daten aus der physikalischen Chemie des Hämoglobins 21
V. Die Donnan-Versuche 40
VI. Die Geschwindigkeitsversuche 51
VII. Einige physiologische Bemerkungen 58
VIII. Zusammenfassung 62

I. Einleitung.

In den Jahren 1908—09 erschienen die jetzt klassischen Arbeiten von J. L. Henderson und Spiro sowie J. L. Henderson über das Ionengleichgewicht im Organismus; zwei Sätze von weittragender Bedeutung wurden hier festgestellt:

1. Das Massenwirkungsgesetz ist für das CO_2-Gleichgewicht im Organismus wie in einfachen Lösungen verwendbar;

2. Die Verteilung von Bicarbonat, Chlor und Wasser zwischen Plasma und Erythrocyten bei variiertem CO_2-Druck ist durch einen rein physikalisch-chemischen Vorgang zu erklären.

Seit dieser Zeit sind diese zwei Sätze von zahlreichen Forschern experimentell beleuchtet und anscheinend verifiziiert worden. Das Massenwirkungsgesetz in der für die Blutkomponente anzuwendenden Form lautet

$$\frac{1}{x\,[H^{\cdot}]} = \frac{1}{K_I} \cdot \frac{y\,[HCO_3']}{z\,[CO_2]} = \frac{1}{K_I} \cdot \frac{y\left[\text{Vol.-\% Total-}CO_2 - \frac{\varphi_{CO_2} \cdot \alpha_{CO_2}}{7 \cdot 6}\right]}{z\,\frac{\varphi_{CO_2} \cdot \alpha_{CO_2}}{7 \cdot 6}}$$

$$\frac{1}{[H^{\cdot}]} = \frac{1}{K_I^*} \cdot \frac{7.6\,\text{Vol.-\% Total-}CO_2 - \varphi_{CO_2} \cdot \alpha_{CO_2}}{\varphi_{CO_2} \cdot \alpha_{CO_2}}$$

wo x, y und z = die Aktivitätskoeffizienten der $H^{\cdot}$- und HCO_3'-Ionen, sowie des gelösten CO_2; K_I = die „scheinbare erste Dissoziationskonstante des

CO_2''; φ_{CO_2} = Druck des CO_2 in mm Hg; α_{CO_2} = Absorptionskoeffizient des CO_2; $K_I^* = K_I \cdot \frac{z}{x \cdot y}$.

Aus einer Betrachtung dieses Satzes erhellt, dass die Voraussetzung seiner Anwendung ist, dass die Kohlensäure im Blute nur als gelöstes CO_2, hydratisiertes CO_2 (H_2CO_3) und Bicarbonat (HCO_3') vorkommt.

Der zweite Satz schliesst mehrere Probleme ein; aus der zweiten Mitteilung von Spiro und Henderson (Biochem. Z. **15**, 1908) möchte ich gern zitieren:

„Wenn Kohlensäure in das Blut eingeleitet wird und sich im Plasma löst, so dringt sie schnell in die roten Blutkörperchen ein, wobei die folgenden chemischen Veränderungen stattfinden. Im Plasma findet eine Reaktion statt zwischen den Natrium-Eiweissverbindungen und der Kohlensäure, wobei $NaHCO_3$ gebildet wird. In den Blutkörperchen findet dieselbe Reaktion statt, mit den Kalium-Eiweissverbindungen aber in grösserem Massstabe wegen des weit grösseren Eiweissgehaltes der Zellen. Aber auch hier findet eine Reaktion statt zwischen Kaliumphosphat und Kohlensäure, wobei Kaliummonophosphat und Kaliumbicarbonat gebildet werden. Dies sind wahrscheinlich die einzigen wichtigen Reaktionen, die stattfinden können. [Henderson, Amer. J. Physiol. **21**, 427 (1908) (S. 119—120.)]"

„Da nun schliesslich die chemischen Reaktionen, welche durch die Kohlensäure eingeleitet sind, vollkommen im Gleichgewicht und umkehrbar sind, so ist es auch klar, dass beim Verjagen der Kohlensäure mit Luft die Bewegung der Reaktionen durch die Zellenwand umgekehrt und der ursprüngliche Gleichgewichtszustand hergestellt werden muss. (S. 121.)"

Ich habe hier nicht Spiro u. Hendersons Deutung der Chlorwanderung zitiert; nach der Arbeit von Donnan (1911) über Membranengleichgewichte musste sie modifiziert werden; wir kehren aber später auf dieses Problem zurück (Kap. VII).

Aus den Zitaten sind zwei Punkte hervorzuheben:

a) Spiro und Henderson meinten, dass die grössere Eiweisskonzentration (d. h. Pufferkonzentration) der Blutkörperchen die Ursache ihres grösseren CO_2-Bindungsvermögens wäre.

b) Spiro und Henderson meinten, dass der CO_2-Umsatz im Blute sich durch Hydratisierung bzw. Anhydrierung der Kohlensäurekomponente abspielte.

Diese Anschauungen sind wohl heute von allen Physiologen angenommen.

In den Jahren 1924—25 führte eine Reihe von Versuchen (die im Kap. V referierten Donnan-Versuche) den Verfasser vorliegender Arbeit zu der Überzeugung, dass ein Teil der CO_2 in Lösungen von Hämoglobin und CO_2 komplex an Hämoglobin gebunden ist. Die erste Konsequenz dieses Phänomens musste sein, dass die einfache Anwendung des angeführten Massenwirkungsausdruckes unzulässig ist; zweitens schien es natürlich dem Hämoglobin dieselbe Rolle für den CO_2-Transport durch diese Komplexbildung wie für den O_2-Transport durch die O_2-Komplexbildung zuzuschreiben; diese Auffassung führte mich zu einer Berechnung der Geschwindigkeiten der Gleichgewichtseinstellung zwischen Blut und einer CO_2-haltigen Gas-Phase; sie gab das Resultat, dass das Gleichgewicht sich so langsam einstellen würde, falls es durch einfache Anhydrierung bzw. Hydratisierung der Kohlensäurekomponente vor sich

gehen sollte, dass die Zeit des Capillarkreislaufes bei weitem nicht reichen würde.

Die Berechnung war die folgende:

Faurholt (1925) hat die Geschwindigkeiten der Hydratisierung des CO_2 und der Anhydrierung der H_2CO_3 und HCO_3 bei 0° und 18° C bei verschiedenen Wasserstoffionenaktivitäten und Ionenstärken gemessen. Bei einer Reaktion nahe am Neutralpunkt verlaufen beide Prozesse langsam; wird eine annähernd neutrale Lösung mit einer kohlendioxydhaltigen Gasphase in Berührung gebracht, so vergeht verhältnismässig viel Zeit, bevor sich das Gleichgewicht einstellt.

Die Tabellen 1 und 2 sind aus Faurholts Zahlen für paH 7,45 berechnet; die Werte entsprechen somit der physiologischen Mittelreaktion. Das Gleichgewicht stellt sich nach einer monomolekularen Formel ein; die Zahlen sind für unendliche Verdünnung gültig; Ionenstärken von 0,1 haben nur geringen Einfluss auf die Geschwindigkeiten; die Werte für 37° C sind von mir mittels der van't Hoffschen Gleichung extrapoliert.

Tabelle 1. Briggsche Log.-Sekunden.

Temperatur °C	Umgesetzte Menge von Kohlensäurekomponenten			Gleichgewichts-konstante
	90 %	99 %	99,9 %	
0	625 Sek.	1250 Sek.	1875 Sek.	0,0016
18	79 „	158 „	237 „	0,0126
(37)	(etwa 12,6 „)	(etwa 25,2 „)	(etwa 37,8 „)	(0,079)

Tabelle 2.

Zeit-Sek.	0° C—K = 0,0016	18° C—K = 0,0126	37° C—K = 0,079
1	0,4 %	3 %	16 %
2	0,7 %	6 %	30 %
5	2,0 %	14 %	75 %
10	4,0 %	25 %	84 %
20	7,0 %	44 %	97 %

Betrachten wir jetzt den CO_2-Wechsel in den Lungen: Es sei gesetzt:

Die durchschnittliche Länge der Blutcapillaren gleich 0,3 mm und die durchschnittliche Geschwindigkeit des Kreislaufs in den Capillaren gleich 0,3 mm in der Sekunde; im Laufe etwa einer Sekunde passiert das Blut somit die Lungencapillaren; mit diesen Grössen rechnen z. B. Krogh, Hartridge und Roughton;

der respiratorische Quotient = 0,85 mit einer O_2-Aufnahme = 7 Vol.-% und einer CO_2-Abgabe = 6 Vol.-%;

der CO_2-Gleichgewichtsdruck des Venenblutes = 60 mm Hg;
der CO_2-Druck der Alveolenluft = 40 mm Hg;
Serumvolumen = 60% des Blutvolumens;
Erythrocytenvolumen = 40% des Blutvolumens;
Bohrs Werte für α_{CO_2}, den Absorptionskoeffizient des Kohlendioxyds im Serum und Erythrocytenbrei:

Tabelle 3.

	0° C	18° C	37° C
Serum	1,66	0,91	0,54
Erythrocytenbrei .	1,37	0,75	0,45

Während der Passage durch die Lungen geht dann das Blut von einem CO_2-Gleichgewichtsdruck von 60 mm Hg zu einem Gleichgewichtsdruck von 40 mm Hg, und hierdurch wird ausgewechselt:

0° C
- Vom Serum: $\frac{(60-40)\cdot 1{,}66}{760} = 4{,}37$ Vol.-% gel. CO_2
- Von den Erythrocyten: $\frac{(60-40)\cdot 1{,}37}{760} = 3{,}60$ Vol.-% gel. CO_2
- Vom Blute: $4{,}37 \cdot 0{,}60 + 3{,}60 \cdot 0{,}40 = 4{,}0$ Vol.-% gel. CO_2

und

18° C
- Vom Serum: $\frac{(60-40)\cdot 0{,}91}{760} = 2{,}36$ Vol.-% gel. CO_2
- Von den Erythrocyten: $\frac{(60-40)\ 0{,}75}{760} = 1{,}95$ Vol.-% gel. CO_2
- Vom Blute: $2{,}36 \cdot 0{,}60 + 1{,}95 \cdot 0{,}40 = 2{,}20$ Vol.-% gel. CO_2

samt

37° C
- Vom Serum: $\frac{(60-40)\cdot 0{,}54}{760} = 1{,}42$ Vol.-% gel. CO_2
- Von den Erythrocyten: $\frac{(60-40)\cdot 0{,}45}{760} = 1{,}18$ Vol.-% gel. CO_2
- Vom Blute: $1{,}42 \cdot 0\,60 + 1{,}18 \cdot 0{,}40 = 1{,}30$ Vol.-% gel. CO_2

Im ganzen soll das Blut 6 Vol.-% abgeben; es restiert also zum Austausch:

Bei 0° C . . . . . $6 - 4{,}0 = 2{,}0$ Vol.-% gebundenes CO_2
„ 18° C . . . . . $6 - 2{,}2 = 3{,}8$ „ „ „
„ 37° C . . . . . $6 - 1{,}3 = 4{,}7$ „ „ „

Der Umsatz der gebundenen CO_2 im Blute wird durch die Erythrocyten bewerkstelligt (Spiro und Henderson, Milroy, Hasselbalch, Joffe und Poulton, van Slyke u. v. a.). In unserem Beispiel wird somit ausgewechselt:

Bei 0° C . . . . . $2/0{,}4 = 5{,}0$ Vol.-% geb. CO_2 von den Erythrocyten
„ 18° C . . . . . $3{,}8/0{,}4 = 9{,}5$ „ „ „ „ „ „
„ 37° C . . . . . $4{,}7/0{,}4 = 11{,}75$ „ „ „ „ „ „

Geht der Austausch dieses gebundenen CO_2 durch eine Anhydrierung der Kohlensäure vor sich, so würde der Prozess sehr viel Zeit fordern. Ein Blick auf Tabelle 2 zeigt, dass in einer Sekunde (der Zeit, im Laufe welcher der Austausch sich tatsächlich in den Lungencapillaren abspielt), nur

bei 0° C 0,4%
„ 18° C 2,8%
„ 37° C 16,6%

der Mengen sich durch eine Anhydrierung von Kohlensäure umsetzen können.

Der CO_2-Austausch in den Lungen lässt sich also nicht durch eine einfache Anhydrierung der Kohlensäure erklären.

In den Donnan-Versuchen hatte ich also experimentell bewiesen, dass ein Teil des in Hämoglobinlösungen – d. h. in den Erythrocyten — vorhandenen gebundenen CO_2 aller Wahrscheinlichkeit nach komplex an das Hämoglobin gebunden ist; aus den Versuchen von Faurholt weiss man, dass die Gleichgewichtseinstellung zwischen CO_2 und den CO_2-Komplexen Carbamin- und Alkylkohlensäuren „momentan" ist; aus den angeführten Berechnungen ergibt sich, dass die schnelle CO_2-Abgabe aus dem Blute sich nicht durch eine einfache Anhydrierung von Kohlensäure abspielen kann; es lag somit auf der Hand, anzunehmen, dass die tatsächliche, schnelle CO_2-Abgabe durch eine „momentane" Gleichgewichtseinteilung zwischen dem CO_2-Hämoglobinkomplex und der Alveolenluft vor sich geht, und die nächste Aufgabe musste sein, experimentell nachzuweisen, dass Hämoglobinlösungen — nicht aber Sera — die Fähigkeit besitzen, einen Teil ihres anwesenden, gebundenen CO_2 sehr schnell abzugeben, wenn sie einem verminderten CO_2-Gleichgewichtsdruck ausgesetzt werden. Mittels der in Kap. VI beschriebenen „Explosions"-Versuche gelang es, diesen Beweis zu führen. Ferner konnte ich zeigen, dass Oxyhämoglobinlösungen weniger CO_2 komplex zu binden vermögen, als es dieselben Lösungen in reduziertem Zustand tun, wenn sie mit CO_2-Drucken zwischen 0 und etwa 90 mm Hg im Gleichgewicht sind; dies ist ein Vorgang, der der Oxydationskinetik des Hämoglobins in Gegenwart von CO_2 ganz analog ist.

In fünf vorläufigen Mitteilungen im 200. Band der Biochem. Z. (1928) habe ich die Hauptzüge meiner Versuche und Überlegungen wiedergegeben. Ich schlug hier den Namen Carbhämoglobin für den nachgewiesenen CO_2-Hämoglobinkomplex vor. Bei einer zusammenfassenden Darstellung befindet man sich sichtlich der Ordnung des Stoffes in folgender Verlegenheit. Die Reaktionskinetik des CO_2-Wechsels durch das Carbhämoglobin zwingt uns zu einer neuen Bewertung der Ionengleichgewichte im Organismus; die Zeit scheint aber für einen historischen Rückblick noch nicht reif; ich werde mich daher hier auf die physikalisch-chemische Seite der Frage beschränken nach folgendem Plan:

I. Einleitung.

II. Eine Übersicht der Literatur der allgemeinen physikalischen Eiweisschemie im Lichte der Bjerrumschen Ampholytheorie mit spezieller Berücksichtigung der Komplexbindung von Ionen (und Gasen) an die Eiweissmolekel und auf die elektrischen Umladungen der Eiweissmolekel; aus dieser Übersicht aus der allgemeinen Eiweisschemie erhellt, dass die Komplexbindung von CO_2 an Hämoglobin unter gleichzeitiger Elektronegativierung der Eiweissmolekel nur als ein Spezialfall anzusehen ist.

III. Eine Übersicht der allgemeinen Dissoziationsgesetze des CO_2 in wässerigen Lösungen im Lichte der Aktivitätstheorie, sowie eine Kritik der theoretischen Grundlage der bisherigen Deutungen der Messungen der „ersten Dissoziationskonstante des CO_2" in Hämoglobinlösungen; es geht hieraus hervor, dass die schönen Versuche von Stadie und Hawes (1928) nur durch eine Komplexbindung von CO_2 an das Hämoglobin erklärt werden können.

IV. Eine Übersicht der speziellen physikalischen Hämoglobinchemie der letzten 30 Jahre; ein Teil dieses Kapitels ist vielleicht nicht von direktem Interesse für das Carbhämoglobinproblem; ich glaube aber, dass es wichtig ist, die hier behandelten Tatsachen und ihre theoretische Basis ganz klar vor Augen zu halten, bevor man mit den Carbhämoglobinversuchen weitergeht; die theoretischen Fundamente sind nämlich nicht alle gleich sicher.

V. Einen genaueren Überblick über meine Donnan-Versuche; die Beweisführung ist hier in einer etwas anderen Weise als in der vorläufigen Mitteilung durchgeführt; ferner sind die dort kurz besprochenen Chloranalysen hier näher berücksichtigt und — wie ich meine — eine Komplexbindung vor Chlor(ionen) an den Hämoglobinmolekeln nachgewiesen.

VI. Eine Übersicht meiner „Explosionsanalysen", sowie eine Diskussion ihrer Beweiskraft.

VII. Einige physiologische Bemerkungen.

VIII. Zusammenfassung.

II. Einige Betrachtungen über die allgemeine physikalische Chemie der Eiweissstoffe.

Im Jahre 1900 gab Hardy an, dass wärme-koaguliertes Hühnereiweiss in einem Kataphoreseversuch gegen die Anode wandert, wenn es in stark verdünntem Alkali suspendiert ist, während es gegen die Kathode wandert, wenn es in stark verdünnter Säure suspendiert ist; im ersten Fall müssen die Partikeln also negativ, im zweiten Fall positiv geladen sein. Weil man die Ladung durch Zusatz einer kleinen Menge von Säure bzw. Alkali ändern kann, muss ein Punkt zu finden sein, wo die Partikeln und das Dispersionsmittel isoelektrisch sind. Gleichzeitig konnte Hardy auch Schulzes Valenzregel (von 1882) erweitern, indem er nachwies, dass Kolloide nur von entgegen-

gesetzt geladenen Ionen gefällt werden und zwar um so stärker, je höher die Valenz der Ionen ist.

1903 meinte Hardy die Ladung der Proteine dadurch erklären zu müssen, dass die Ionen des Dispersionsmittels die kolloiden Partikeln „durchdringen": hier würden sich die schnellsten Ionen (also $H^{\cdot}$ und OH') am stärksten geltend machen, und je nach dem die Flüssigkeit sauer oder alkalisch war (d. h. einen Überschuss von $H^{\cdot}$ bzw. OH'-Ionen enthielt) würden die Partikeln positive bzw. negative Ladung annehmen. Bei der Aufladung wurde die Oberflächenenergie und damit die Durchschnittsgrösse der Partikeln geändert; Hardy war damals nicht der Meinung, dass das „Aufnehmen" der Partikeln von Ionen dem Gesetz der multiplen Proportionen folgte.

1904 vertrat J. Loeb die Anschauung, dass die Eiweissstoffe Ampholyte sind, die sowohl $H^{\cdot}$ als OH'-Ionen abspalten; werden mehr $H^{\cdot}$- als OH'-Ionen abgegeben, so wird der Eiweissstoff negativ elektrisch gegen das Lösungsmittel, — umgekehrt, wenn mehr OH'-Ionen abgegeben werden.

In seiner klassischen Globulinarbeit (1905) verliess Hardy (unabhängig von Loeb) die vage adsorptionstheoretische Auffassung zugunsten „a frankly chemical standpoint": Globulin ist ein Ampholyt, die Globulinsalze folgen den Gesetzen der multiplen Proportionen und der Massenwirkung; die Wanderungsgeschwindigkeit steigt dem Hydrolysegrad proportional, und die Valenzregel gilt für Globulinlösungen.

Diese Ansichten über die Natur der Eiweissstoffe wurden bald von den meisten Forschern angenommen und fanden weitere Unterstützung durch die ausgiebigen experimentellen Ergebnisse von besonders Mellanby (1905), Michaelis (1908—14), Sörensen (1909, 1912 und 1917), Loeb (1918—22), van Slyke (1920—25) ausser vielen anderen.

Nach F. Hofmeister und E. Fischer fassen wir die Eiweissstoffe als Derivate — hauptsächlich aliphatischer[1] — Polyamino-Polycarbonsäuren auf. Den früher geltenden Anschauungen gemäss wäre die Dissoziationsneigung der Säure- und Basegruppen solcher Stoffe eine sehr schwache. Nach Bjerrums (1923) Theorie müssen wir indessen unsere Anschauungen über das physikalische Verhalten derartiger Ampholyte ganz wesentlich ändern. Bjerrum zeigte, dass es unwahrscheinlich ist, dass die Dissoziation der Carboxylgruppen von der gewöhnlichen Grössenordnung für Carbonsäuren (10^{-2} bis 10^{-5}) bis auf ganz minimale Werte (10^{-8}—10^{-14}) nur durch Einführen von Aminogruppen in die Molekel herabgesetzt sei; im Gegenteil müsse man erwarten, dass eine elektropositive $NH^{\cdot}_3$-Gruppe das $H^{\cdot}$ einer COOH-Gruppe abstosse, so dass die Dissoziation der Säure vergrössert wird. Dementsprechend müsste man erwarten, dass die Einführung einer elektronegativen

[1] Man beachte jedoch die höchst anregenden Arbeiten von Troensegaard aus den letzten Jahren über den Aufbau der Proteine; hinsichtlich der puffernden Gruppen der genuinen Proteine berühren Troensegaards Anschauungen wohl aber kaum die folgenden Überlegungen.

COO′-Gruppe das Aufnehmen eines H′-Ions aus dem Wasser an eine NH_2-Gruppe erleichterte, so dass auch die Basendissoziation stärker als in Ammoniak (10^{-5}) werde, anstatt zu ganz niedrigen Werten zu sinken (10^{-8}—10^{-14}).

Nach der klassischen Auffassung existiert eine Aminosäure in 3 Formen

$$\cdot H_3N \cdot R \cdot COOH$$
$$H_2N \cdot R \cdot COO'$$
$$H_2N \cdot R \cdot COOH$$

während die Amphoionform

$$\cdot H_3N \cdot R \cdot COO'$$

nur in verschwindend kleinen Mengen vorhanden wäre.

Nach Bjerrum ist die Amphoionform bei den aliphatischen Aminosäuren die weit überwiegende (über 99%); bei den aromatischen Aminosäuren macht sie 10—90% aus; bei Aminophenolen ist sie nur in minimalen Quantitäten vorhanden.

Die alten Konstanten für eine Aminosäure (A) waren:

$$\frac{[A'] \cdot [H^{\cdot}]}{[A]} = K_a \text{ und } \frac{[A^{\cdot}] \cdot [OH']}{[A]} = K_b$$

während Bjerrums Konstanten für die Säuredissoziation (K_S) und die Basedissoziation (K_B)

$$\frac{[A^{\cdot\prime}] \cdot [H^{\cdot}]}{[A^{\cdot}]} = K_S \text{ und } \frac{[A^{\cdot\prime}] \cdot [OH']}{[A']} = K_B$$

werden.

Da die alte [A] gleich Bjerrums [A$^{\cdot\prime}$] ist, gibt sich

$$K_S = \frac{K_w}{K_b} \text{ und } K_B = \frac{K_w}{K_a}$$

d. h. die alten Konstanten, K_a und K_b, waren nicht Säure- bzw. Basekonstanten, sondern Hydrolysekonstanten für bzw. Base und Säure.

Streng genommen muss man K_S und K_B folgenderweise definieren

$$K_S = \frac{[A^{\cdot\prime}] \cdot [H^{\cdot}]}{[A^{\cdot}]} + \frac{[A'] \cdot [OH']}{[A]}$$

und

$$K_B = \frac{[A^{\cdot\prime}]\ [OH']}{[A']} + \frac{[A^{\cdot}]\ [OH']}{[A]}$$

d. h., dass K_S = die Summe der Säurekonstante des Amphoions und der Hydrolysekonstante des Amins, — und K_B = die Summe der Basekonstante des Amins und der Hydrolysekonstante des Salzes der Amphoionsäure.

Bei den aliphatischen Aminosäuren braucht man nicht die Hydrolysekonstanten zu berücksichtigen; bei den Aminophenolen nicht die Säure- und Basekonstanten; bei den aromatischen Aminosäuren sind die zwei Konstanten von derselben Grössenordnung. Die aliphatischen Aminosäuren sind somit als innere Salze anzusehen und dürfen nicht als gleichzeitig Säure und Base

aufgefasst werden. Die Säure- und Basegruppen haben Salz miteinander gebildet, und die sauren bzw. basischen Eigenschaften sind durch die Hydrolyse zu erklären. Hätte man sich vorgenommen, die Stärke von Säuren und Basen durch die Hydrolysenkonstanten ihrer totaldissoziierten Salze anzugeben, dann wären die alten Bezeichnungen K_b und K_a die korrekten; da man aber die Dissoziationskonstanten der Säuren und Basen braucht, sind K_S und K_B die richtigen.

Betrachten wir eine Mono-Amino-Mono-Carbonsäure wie Glycin, haben wir:

$$K_S = \frac{K_w}{K_b} = \frac{10^{\div 14,14}}{10^{\div 11,8}} = 10^{\div 2,34}; \quad K_B = \frac{K_w}{K_a} = \frac{10^{-14,14}}{10^{-10}} = 10^{\div 4,14}$$

und

$$pK_S = 2,34; \quad pK_B = 4,14;$$

samt

$$J = \sqrt{K_w \cdot \frac{K_S}{K_B}} = 10^{\div 6,17}; \quad pJ = 6,17.$$

Wir sehen hierdurch:

1. Die Pufferwirkung der Säuregruppe entfaltet sich in der Umgegend von pH 2,34;

2. die Pufferwirkung der Basegruppe entfaltet sich in der Umgegend von pH 10;

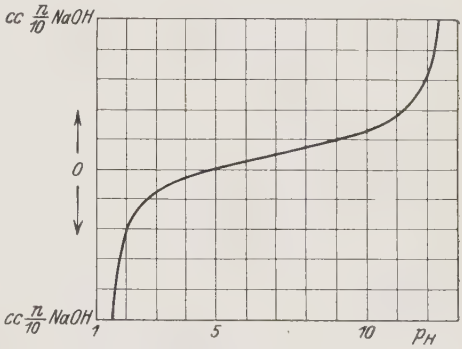

Abb. 1. Titrierungskurve einer 1%igen Caseinlösung.

3. bei isoelektrischer Reaktion sind sowohl die Säuren- als die Basengruppe total dissoziert; d. h. die Summe der negativen + der positiven Ladungen ist ein Maximum und nicht wie früher angenommen, ein Minimum.

Betrachten wir dann eine Poly-Amino-Polycarbonsäure, wie z. B. einen Eiweissstoff, müssen wir erwarten, dass der Hauptteil der Säure- und Basedissoziationskonstanten zwischen 10^{-1} und 10^{-5} liegen, während nur wenige der bezüglichen Gruppen schwächer dissoziert seien; d. h. wir erwarten grosse Säurepufferwirkung von paH 0—5, grosse Basenpufferwirkung von paH 9—14 und nur geringfügige Pufferwirkung zwischen paH 5 und 9. Eine Titrationskurve von einer Eiweisslösung bestätigt diese Vermutung. Abb. 1 zeigt die Titrationskurve einer 1%igen Caseinlösung.

Wir sehen, dass die Pufferwirkung zwischen paH 1 und 4,5 sowie paH 9 und 14 sehr gross ist, während sie klein zwischen paH 4,5 und 9 ist, wo nur wenige Gruppen in die Dissoziation treten. Der isoelektrische Punkt des Caseins entspricht etwa paH 4,8 und hier ist also die Summe der positiven und der negativen Ladungen ein Maximum insgesamt die Summe der positiven gleich die Summe der negativen Ladungen.

Vergrössert man die Wasserstoffionenaktivität einer Eiweisslösung, so werden H^+-Ionen von Eiweiss aufgenommen, und die Eiweissmolekel werden

stärker elektropositiv; vermindert man die Wasserstoffionenaktivität, so werden H·-Ionen abgegeben, und die Eiweissmolekel werden stärker elektronegativ. Bei pH 0—5 spielen sich diese Prozesse hauptsächlich durch

$$R \cdot COO' + H^{\cdot} \rightleftarrows R \cdot COOH$$

ab und bei paH 9—14 durch

$$R \cdot NH_2 + H^{\cdot} \rightleftarrows R \cdot NH^{\cdot}_3$$

bei paH 5—9 sind beide Prozesse von derselben Grössenordnung.

Da die Eiweissstoffe Amphoionen sind, müssen sich Eiweisssalze an beiden Seiten des isoelektrischen Punktes bilden können; es ist auch Sörensen (1917) und Sörensen und Palitsch (1923) gelungen, solche Salze darzustellen; sie konnten Proteinsulfat bzw. Proteinphosphat krystallisieren bei Reaktionen, die entweder alkalischer oder saurer als die isoelektrische Reaktion waren. Wie bekannt ist es auch möglich, Hämoglobinbicarbonat bei pH etwa 7 auszufällen, eine Reaktion, die erheblich alkalischer als die isoelektrische ist.

Als Amphoionen müssen die aliphatischen Aminosäuren sich in bezug auf die Aktivität als Elektrolyte verhalten; das ist auch von Möller und Faurholt (ref. Bjerrum 1923) und Rördam (1925) nachgewiesen: die Aminosäuren vermindern die Aktivität gelöster Salze, und ihre eigene Aktivität wird von gelösten Salzen vermindert. Da die Amphoionen aber sowohl positiv als negativ geladen sind, ist die Hemmung schwächer als bei gewöhnlichen positiven oder negativen Ionen.

Dass die Proteine in derselben Weise reagieren, sehen wir aus den Versuchen von Mellanby (1905), in denen quantitativ demonstriert wurde, dass in destilliertem Wasser unlösliches Globulin durch Salzzusatz in Lösung zu bringen ist. Dasselbe gilt in geringerem Grad von dem Hämoglobin, das viel löslicher in physiologischer Salzlösung als in destilliertem Wasser ist. Da die Aktivitätsänderung der Löslichkeitsänderung umgekehrt proportional ist, können wir die Versuche als Aktivitätsmessungen auffassen. Leitfähigkeitsbestimmungen zeigen dasselbe: Die Leitfähigkeit von destilliertem Wasser steigt dem Proteinzusatz proportional und die Leitfähigkeit von Salzwasser sinkt dem Proteinzusatz proportional (Polányi 1920, Palmer, Atchley und R. F. Loeb 1921, H. C. Gram und Culem 1923, Wo. Pauli 1924 und Atchley und Nichols 1925).

Wenn man durch Änderungen der Wasserstoffionenaktivität einer Eiweisslösung den Ladungssinn der Eiweissmolekel ändert, ruft man gleichzeitig Veränderungen verschiedener anderer physikalischer Eigenschaften des Eiweissstoffes hervor (Löslichkeit, Oberflächenspannung, osmotischer Druck usw.). Dieselben Variationen kann man durch Zufügen verschiedener Anionen oder Kationen zu der Lösung bewerkstelligen. Die Wirkungsfähigkeit der Ionen ist scheinbar ohne Beziehung zu den allgemeinen physikalischen Eigenschaften der bezüglichen Ionen. Diese Phänomene sind zuerst von Hofmeister

(1888—89) nachgewiesen. Es ist indessen von J. Loeb (1918—22) zu zeigen versucht worden, dass diese sog. Hofmeister-Reihen hauptsächlich durch Änderungen der Wasserstoffionenaktivität der Lösung zu erklären seien, und dass die reinen Salzwirkungen der Valenzregel folgen. Loebs Versuche wurden an verdünnten Gelatinelösungen angestellt, und er mass den osmotischen Druck, die Viscosität und das Membranpotential; die Versuche in saurer Lösung scheinen sehr schön zu sein; die Versuche in alkalischer Lösung sind aber nicht sehr genau und erlauben nicht weitgehende Schlussfolgerungen.

So einfach wie von Loeb 1918—22 beschrieben, sind die Verhältnisse aber keineswegs. Erstens ist die H'-Ionenwirkung beim Eiweiss klein gegen die Salzwirkung; so fand Mellanby (1905), dass die H'-Ionenfällung von Globulin nur 8—17% der durch Salze bewirkten Fällung beträgt; und das gleiche gilt von vielen anderen Proteinen. Ferner zeigen mehrere Versuche, dass man in manchen Fällen mit „spezifischen" Bindungen von Salzen an Proteine rechnen muss; Michaelis und Rona (1919) fanden, dass Anionen das Fällungsoptimum für denaturiertes Eieralbumin nach der sauren Seite von paH 5 verschieben, während Kationen es nach der alkalischen Seite verschieben; Michaelis und v. Szent-Györgyi (1920) zeigten dasselbe für Casein. Mit Northrops (1922) Mikrokataphoreseapparat unternahmen J. Loeb und Mitarbeiter (1922—24) eine Reihe von Experimenten über den Einfluss von Salzen auf die Ladung mikroskopisch sichtbarer Eiweisspartikel; die Grösse der Ladung wurde mittels der Helmholtz-Lamb-Perrinschen Formel berechnet. Sie fanden hier, dass verschiedene Ionen — besonders die polyvalenten — die Partikelladung bis 40 Millivolt zu ändern vermögen, ohne Rücksicht darauf, ob der paH grösser oder kleiner ist als der paH, der dem isoelektrischen Punkt in salzfreien Proteinlösungen entspricht. Negative Ionen negativieren den Eiweissstoff, positive Ionen positivieren ihn.

Northrop und Kunitz (1923) stellten einige schöne Versuche mit Zinksalzen in Gelatinelösungen an; sie massen die Wasserstoff- und Zinkionenaktivitäten elektrometrisch. Da sie die Zinkionenaktivität weit geringer als berechnet fanden, schlossen sie, dass Zink von Gelatine komplex gebunden wird. Beim Zinkzusatz sinkt der paH (von 4,8—3,95); da die Bindung momentan und reversibel ist, meinten sie ein chemisches Gleichgewicht als Erklärung des Phänomenes und nicht eine Adsorption annehmen zu müssen. Bis 60% des Zinkes wurden als komplex gebunden gefunden.

In einer Reihe von Arbeiten kamen Pauli und Mitarbeiter (1924—25) zu ähnlichen Resultaten; sie fanden $Zn^{\cdot\cdot}$, Cl' (und $H^{\cdot}$) in grosser Menge an Glutin und Albumin komplex gebunden.

Während Michaelis und Mitarbeiter in ihren vielen Makrokataphoreseversuchen mit Eiweissstoffen meistens scharfe isoelektrische paH-Werte nachweisen konnten, fanden Michaelis und Davidsohn 1912 den isoelektrischen Punkt des Hämoglobins in Kakodylatpuffern — 6,55—7,04

und in sehr verdünnten Phosphatpuffern = 6,62—6,92; in stärkeren Salzlösungen (= 0,1 n Na') wurde aber der p_J noch „unschärfer" gefunden und zwar = 5,85—7,31. Diese Umladung mittels Salzzusatzes deutet in derselben Richtung wie die obengenannten Versuche.

Sörensen hat die Menge von Hydratwasser in Albuminsulfatkrystallen (1917) und Albuminphosphatkrystallen (Sörensen und Palitsch 1923) bestimmt; das Sulfat enthielt 22% und das Phosphat 27% Hydratwasser. Sörensen ist der Meinung, dass die Eiweissstoffe auch in Lösung dieselben Mengen Wasser als Hydratwasser binden, d. h., dass die Proteine verschiedene Mengen von Wasser binden je nach der Art und Menge von Salzen in der Lösung, und das bedeutet weiter, dass nicht alles Wasser einer Proteinlösung als Lösungswasser für die Salze anzunehmen ist. In konzentrierteren Eiweisslösungen spielt dieses Verhalten eine nicht bedeutungslose Rolle für die Berechnungen von Ionen-Aktivitäten in der Lösung. Auch dieses Phänomen deutet stark auf eine „spezifische" Wirkung des Salzes.

Nach den oben referierten Versuchsergebnissen aus der Literatur wollen wir schliessen, dass die Eiweissstoffe sich als Ampholyte in Bjerrums Auffassung verhalten. In vielen Fällen müssen wir ferner damit rechnen, dass „spezifische Bindungen" zwischen gelösten Proteinen und gelösten Salzen vorkommen; diese Reaktionen scheinen reversible zu sein und sich auf ein Gleichgewicht einzustellen, bei welchem eine gewisse Menge der bezüglichen Ionen an das Protein gebunden ist, und eine gewisse Menge frei in Lösung ist. Durch die Bindung eines Kations oder Anions wird erstens eine negative bzw. positive Ladung des Proteinmolekels neutralisiert: ist das Ion di- oder polyvalent, so kann man sich denken, dass die Restvalenzen als freie negative bzw. positive Ladungen an dem Ionen-Proteinmolekel sitzen, oder dass auch die Restvalenzen entgegengesetzte Ladungen desselben oder eines benachbarten Proteinmolekels sättigen. In die letztgenannte Richtung deuten die Salzwirkungen auf die Oxydation von Hämoglobin; die Theorie der Aggregation von Hämoglobinmolekeln durch Salze ist zuerst von A. V. Hill formuliert (1910) (v. i.) worden.

Ausser dieser sozusagen direkten Umladung des Proteinmoleküls durch die Bindung eines Ions an eine bestimmte Säure- oder Basengruppe muss man indessen auch eine andere Art von Ladungsänderung erwarten, und zwar durch Beeinflussung der Dissoziationsneigung benachbarter Säure- und Basengruppen auf das Proteinmolekül. Derartige Änderungen der Dissoziationskonstante einer Säure- oder Basengruppe durch Einführung von elektropositiven oder -negativen Elementen in das Molekel sind gewöhnlich bei z. B. Polycarbonsäuren, Polyaminen, Polyamino-Polycarbonsäuren, Oxysäuren, chlor- oder bromsubstituierten Säuren usw. (Vide Bjerrum 1923.)

Das Ionen-Protein-Molekel ist somit nicht bloss als ein Stoff mit anderer Ladungsqualität als der reine Proteinstoff in Lösungen von derselben Wasser-

stoffionenaktivität zu betrachten; sondern es ist ein neuer Stoff mit anderen Dissoziationskonstanten seiner Säuren- und Basengruppen und deshalb auch mit anderem isoelektrischen Punkt der Wasserstoffionenaktivität gegenüber.

Einen ganz analogen Vorgang treffen wir in der Oxydation des Hämoglobins; nur ist das zu bindende O_2 kein Elektrolyt, sondern eine nicht geladene Molekülart; diese Oxydation des Hämoglobins ist aber auch ein reversibler Prozess, der eine Funktion des O_2-Druckes (d. h. der O_2-Konzentration) ist; und das Reaktionsprodukt — das Oxyhämoglobin — ist ein neuer Stoff: er hat einen anderen isoelektrischen Punkt, er ist vielmehr elektronegativ oder — wie man gewöhnlich sagt — er ist eine stärkere Säure als das reduzierte Hämoglobin.

Versuchen wir diesen Verhältnissen einen mathematischen Ausdruck zu geben; wir werden hier nach Brönsted (1923) sowohl die Säure- als die Amindissoziation als Wasserstoffionendissoziationen schreiben

$$\frac{a[H^{\cdot}] \cdot a[R \cdot COO']}{a[R \cdot COOH]} = K_\alpha; \quad \frac{a[H^{\cdot}] \cdot a[R \cdot NH_2]}{a[R \cdot NH_3^{\cdot}]} = K_\beta$$

und übrigens der Bjerrumschen Auffassung folgen. Bei unendlicher Verdünnung können wir Aktivitäten = Konzentrationen setzen:

1.
$$\begin{cases} K_\alpha = \dfrac{a[H^{\cdot}] \cdot a[A^{\cdot\prime}]}{a[A^{\cdot}]} = \dfrac{[H^{\cdot}] \cdot [A^{\cdot\prime}]}{[A^{\cdot}]} \\ K_\beta = \dfrac{a[H^{\cdot}] \cdot a[A']}{a[A^{\cdot\prime}]} = \dfrac{[H^{\cdot}] \cdot [A']}{[A^{\cdot\prime}]} \\ J = \sqrt{K_\alpha \cdot K_\beta} \end{cases}$$

In Gegenwart von Salzen werden die Aktivitäten der Ionen wegen der elektrostatischen Einwirkungen vermindert, und die Konzentrationen müssen mit den zugehörigen Aktivitätskoeffizienten multipliziert werden;

2.
$$\begin{cases} K_\alpha = \dfrac{x[H^{\cdot}] \cdot y[A^{\cdot\prime}]}{z[A^{\cdot}]} \text{ und } K_{\alpha\gamma} = \dfrac{[H^{\cdot}] \cdot [A^{\cdot\prime}]}{[A^{\cdot}]} \\ K_\beta = \dfrac{x[H^{\cdot}] \cdot u[A']}{y[A^{\cdot\prime}]} \text{ und } K_{\beta\gamma} = \dfrac{[H^{\cdot}] \cdot [A']}{[A^{\cdot\prime}]} \\ J_\gamma = \sqrt{K_{\alpha\gamma} \cdot K_{\beta\gamma}} \end{cases}$$

indem $K_{\alpha\gamma}$, $K_{\beta\gamma}$ und J_γ neue Konstanten sind, die die thermodynamischen Konstanten K_α, K_β und J sowie die Aktivitätskorrektionen einschliessen.

Binden sich etwaige Ionen (oder nicht geladene Stoffe) in der einen oder anderen Weise „spezifisch" an die einen oder anderen Arten der Aminosäureionen und ist die Bindung den Aktivitäten der Komponenten dem Massenwirkungsgesetz gemäss proportional, — dann haben wir:

$$\frac{a_X^x \cdot a_S^s}{a_C^c} = K_\sigma$$

wo X = die Aminosäurekomponente, S = den „spezifisch" zu bindenden Stoff, C = die „spezifische" Verbindung, x, s und c = die bezüglichen Molekülzahlen,

mit welchen die Komponenten an der Reaktion teilnehmen und K_σ = die Gleichgewichtskonstante der „spezifischen" Bindung sind.

Wir müssen die entsprechenden Korrektionen in (2) einführen:

$$3. \quad \begin{cases} K_{\alpha\gamma\sigma} = \dfrac{[H^{\cdot}]\cdot[A^{''}]}{[A^{\cdot}]} \\ K_{\beta\gamma\sigma} = \dfrac{[H^{\cdot}]\cdot[A']}{[A^{''}]} \\ J_{\gamma\sigma} = \sqrt{K_{\alpha\gamma\sigma}\cdot K_{\beta\gamma\sigma}} \end{cases}$$

Wie oben erwähnt, müssen wir indessen noch eine Art von Änderungen der Dissoziationskonstanten erwarten, und zwar durch die wegen der „spezifischen" Bindungen geänderten elektrostatischen Verhältnisse in den Aminosäuremolekeln.

Führen wir Korrektionen (μ) für diese Änderungen in (3) ein, kriegen wir

$$4. \quad \begin{cases} K_{\alpha\gamma\sigma\mu} = \dfrac{[H^{\cdot}]\cdot[A^{''}]}{[A^{\cdot}]} \\ K_{\beta\gamma\sigma\mu} = \dfrac{[H^{\cdot}]\cdot[A']}{[A^{''}]} \\ J_{\gamma\sigma\mu} = \sqrt{K_{\alpha\gamma\sigma\mu}\cdot K_{\beta\gamma\sigma\mu}} \end{cases}$$

Für eine Polyamino-Polycarbonsäure wie ein Eiweissstoff müssen wir analog für den isoelektrischen Punkt die folgenden Formeln haben:

In reinem Wasser:

$$5. \quad J = \sqrt{(K_{\alpha_1} + K_{\alpha_2} - - - - K_{\alpha S})\cdot(K_{\beta_1} + K_{\beta_2} - - - K_{\beta N})} = \sqrt{\Sigma K_\alpha \cdot \Sigma K_\beta}$$

$$pJ = \frac{p\,\Sigma K_\alpha + p\,\Sigma K_\beta}{2}$$

(wo S = Anzahl Säuregruppen und N = Anzahl Basengruppen)
und in reaktionskomponentenhaltigen Salzlösungen:

$$6. \quad J_{\gamma\sigma\mu} = \sqrt{K_{\alpha\gamma\sigma\mu_1} + K_{\alpha\gamma\sigma\mu_2} + - - - K_{\alpha\gamma\sigma\mu S})\cdot(K_{\beta\gamma\sigma\mu_1} + K_{\beta\gamma\sigma\mu_2} + - - - K_{\beta\gamma\sigma\mu N})}$$
$$= \sqrt{\Sigma K_{\alpha\gamma\sigma\mu}\cdot\Sigma K_{\beta\gamma\sigma\mu}}$$

$$pJ_{\gamma\sigma\mu} = \frac{p\,\Sigma K_{\alpha\gamma\sigma\mu} + \Sigma K_{\beta\gamma\sigma\mu}}{2}$$

Aus (5) und (6) erhellt, dass das „Stoff"-Protein-Molekül als eine wirklich neue Molekülart anzusehen ist, indem die Korrektionsfaktoren σ und μ nicht bloss äussere physikalische Einflüsse (wie γ), sondern intramolekulare Affinitätsänderungen berücksichtigen.

In meinen Donnan-Versuchen habe ich nachgewiesen, dass in Hämoglobin-CO_2-Lösungen:

1. Die Hämoglobinmolekel elektronegativiert werden, indem der isoelektrische Punkt zur sauren Seite verschoben ist, und bei den vorhandenen Wasserstoffionenaktivitäten die elektrische Ladung der Molekel negativer als in isohydrischen Lösungen ohne CO_2 ist;

2. ein Teil des vorhandenen Total-CO_2 in einer nicht zum Bicarbonat-System gehörenden Form zu finden ist.

Aktivitätstheoretische Erwägungen sowie die Resultate meiner „Explosions“-Analysen erlauben uns den „verschwundenen“ Teil des Total-CO_2 als an den Hämoglobinmolekeln komplex gebunden anzusehen. Vom eiweisschemischen Gesichtspunkt aus ist dieses Phänomen also nur als ein neues Beispiel der in diesem Kapitel mitgeteilten Ergebnisse zu betrachten.

III. Über die „Dissoziation des CO_2“.

Spiro und J. L. Henderson sowie J. L. Henderson (1908—09) waren die ersten, die das Massenwirkungsgesetz für die Dissoziation des CO_2 und des Bicarbonats im Organismus in Anwendung brachten. Hasselbalch (1916) führte den Gedanken weiter und arbeitete seine Methode zur p_H-Bestimmung im Blut mittels volumetrischer Messung des CO_2 aus.

Es scheint lohnend zu sein, von einer rein chronologischen Darstellung abzuweichen und an dieser Stelle einige allgemeine Bemerkungen über die Frage vorauszuschicken.

Wenn eine wässerige Salzlösung mit einer CO_2-haltigen Gasphase kommunisiert, löst sich etwas von dem CO_2 im Wasser; beim Gleichgewicht gilt

1. $$\frac{\text{Vol.-\% gelöstes } CO_2}{\frac{\varphi_{CO_2}}{7{,}60}} = \frac{\text{mM [gelöstes } CO_2] \cdot 7{,}60}{\varphi_{CO_2} \cdot 2{,}24} = \alpha_{CO_2}$$

wo φ = Druck in der Gasphase in mm Hg, α = Bunsenscher Absorptionskoeffizient.

Ein Teil des gelösten CO_2 wird hydratisiert

2. $$\frac{[H_2CO_3]}{[CO_2][H_2O]} = K$$

oder — da die Konzentration des Wassers als konstant und = 1 angesehen werden kann

3. $$\frac{[H_2CO_3]}{[CO_2]} = K_{Hydrat}$$

Die Kohlensäure dissoziiert in Wasserstoff- und Bicarbonationen

4. $$\frac{[H^\cdot] \cdot [HCO_3']}{[H_2CO_3]} = K_{Kohlensäure}$$

und durch Multiplikation mit (3)

5. $$\frac{[H^\cdot] \cdot [HCO_3']}{[CO_2]} = K_{Kohlensäure} \times K_{Hydrat} = K_I$$

samt

6. $$\frac{1}{[H^\cdot]} = \frac{1}{K_I} \cdot \frac{[HCO_3']}{[CO_2]}$$

und

7. $$p_H = p_{KI} + \log \frac{[HCO_3']}{[CO_2]}$$

Diese Gleichungen haben nur Gültigkeit in unendlich verdünnten Lösungen, wo Aktivitäten = Konzentrationen zu setzen sind; in endlich verdünnten Lösungen, wo das nicht der Fall ist, müssen die verschiedenen Konzentrationen mit gehörigen Aktivitätskoeffizienten korrigiert werden, x, y und z für bzw. Wasserstoff- und Bicarbonationen samt CO_2

8. $$\frac{1}{x\,[H^{\cdot}]} = \frac{1}{K_I} \cdot \frac{y\,[HCO'_3]}{z\,[CO_2]}$$

Es ist erlaubt, damit zu rechnen, dass x, y und z konstante Grössen bei gegebener Ionenstärke und konstanter Temperatur sind, und wir können deshalb aus K_1 und den Aktivitätskoeffizienten eine neue Konstante, K_I^*, bilden

$$\frac{1}{[H^{\cdot}]} = \frac{1}{K_I^*} \cdot \frac{[HCO'_3]}{[CO_2]}$$

Da es die letzten Jahre allgemein üblich geworden ist mit der Wasserstoffionenaktivität (und paH) statt der Wasserstoffionenkonzentration (und p_H) zu rechnen, werden wir nur y und z in K_I^* einschliessen, also:

9. $$\frac{1}{a\,[H^{\cdot}]} = \frac{1}{K_I^*} \cdot \frac{[HCO'_3]}{[CO_2]}$$

sowie

10. $$paH = p_{KI}^* + \log \frac{[HCO'_3]}{[CO_2]}$$

Da

11. $$[HCO'_3] + [CO_2] = [\text{Kohlensäure-}CO_2]$$

kriegen wir aus (1), (10) und (11)

12. $$paH = p_{KI}^* + \log \frac{(\text{Vol.-\%}\ (HCO'_3)\text{-}CO_2) \cdot 7{,}6}{\varphi_{CO_2} \cdot \alpha_{CO_2}}$$

$$= p_{KI}^* + \log \frac{\left((\text{Vol.-\%}\ \text{Kohlensäure-}CO_2) \div \frac{\varphi_{CO_2} \cdot \alpha_{CO_2}}{7{,}6}\right) \cdot 7{,}6}{\varphi_{CO_2} \cdot \alpha_{CO_2}}$$

13. $$= p_{KI}^* + \log \psi$$

indem wir den Bruch $= \psi$ setzen

α_{CO_2} ist von Bohr und Bock (1894) für reines Wasser und von Geffcken (1904) auch für Elektrolytlösungen gemessen. Nach Bohr und Bock haben wir

	15° C	18° C	38° C
α_{CO_2}-Wasser	1,019	1,000	0,555

Nach Geffcken können wir schätzen, dass α_{CO_2} eine geradlinige Funktion von der Ionenstärke bis Stärken von 0,3 der folgenden Gleichung gemäss ist:

$$\alpha_{CO_2\text{-Salz}} = \alpha_{CO_2\text{-Wasser}} \cdot (1 \div 0{,}19\ \mu)$$

wo μ = Ionenstärke pr. 1000 g Wasser.

Setzen wir den Aktivitätskoeffizient z, des CO_2 in reinem Wasser = 1, dann ist z in Salzlösungen

$$z = \frac{1}{1 - 0{,}19\ \mu}$$

und

$$pz = \div \log \frac{1}{1 - 0{,}19\ \mu}$$

Bei Ionenstärken von 0,1—0,2 beträgt somit z nur 1,02—1,04 und pz nur : 0,01 — 0,02, Grössen, die wir vernachlässigen können.

Den Aktivitätskoeffizienten der Bicarbonationen können wir aus Hastings und Sendroy (1925) sowie Stadie und Hawes (1928) Messungen kalkulieren

$$py = (0{,}52 \pm 0{,}02)\ \sqrt{\mu}$$

indem diese Formel sowohl für 18° als 38° als annähernd richtig anzusehen ist (cf. Warburg 1922, p. 242). Bei Ionenstärken von 0,1—0,2 beträgt somit y 0,69—0,59 und py 0,16—0,23.

Der Wert von p_{KI} ist von Warburg (1922)

$p_{KI} = 6{,}51$ (18° C)
$= 6{,}33$ (38° C)

von Hastings und Sendroy sowie von Stadie und Hawes

$p_{KI} = 6{,}33$ (38° C)

extrapoliert aus Versuchen mit elektrometrischer paH-Messung und volumetrischer CO_2-Messung in verdünnten Salzlösungen.

Mit unseren heutigen theoretischen und experimentellen Erfahrungen kann gesagt werden, dass die Anwendung des Massenwirkungsausdruckes auf die „Dissoziation des CO_2" in verdünnten Salzlösungen auf recht festem Boden steht.

Wir wollen nunmehr die Verhältnisse im Lösungswasser von Hämoglobinlösungen betrachten. Wir müssen hier einige Annahmen machen, die wir nicht beweisen können, sondern nur als wahrscheinliche Möglichkeiten voraussetzen:

1. Wir nehmen an, dass die Aktivitäten von CO_2 und HCO'_3 dieselben im Lösungswasser wie in proteinfreien Salzlösungen von derselben Ionenstärke sind;

2. wir nehmen an, dass die Hämoglobinmolekel wegen ihrer Grösse nur als monovalentes Ion die Aktivitäten des CO_2 und des HCO'_3 beeinflusst.

In meinen vorläufigen Mitteilungen wurde nachgewiesen, dass ein Teil der in Hämoglobinlösungen vorhandenen CO_2 als an das Hämoglobin komplex gebunden zu betrachten ist. Die Komplexbindung ist eine Funktion der Hämoglobin- und CO_2-Konzentrationen und paH:

$$[\text{Komplex-}CO_2] = F([Hb],\ \varphi_{CO_2},\ \alpha_{CO_2},\ paH)$$

Die Gleichungen (12 und 13) müssen daher korrigiert werden:

14.
$$paH = p_{KI}^* + \log \frac{7{,}6\ (\text{Vol.-}\%\ \textbf{Total}\text{-}CO_2) \div \varphi_{CO_2} \cdot \alpha_{CO_2} \div 7{,}6 \cdot F([Hb],\ \varphi_{CO_2} \cdot \alpha_{CO_2},\ paH)}{\varphi_{CO_2} \cdot \alpha_{CO_2}}$$

$$= p_{KI}^* + \log \psi$$

während

15. $$paH = \textcircled{pK_I} + \log \frac{7{,}6\,(\text{Vol.-}\%\ \textbf{Total-}CO_2) \div \varphi_{CO_2} \cdot \alpha_{CO_2}}{\varphi_{CO_2} \cdot \alpha_{CO_2}}$$

16. $$= \textcircled{pK_I} + \log (\psi + \chi)$$

wo $\chi = \left(\frac{7{,}6}{\varphi_{CO_2} \cdot \alpha_{CO_2}}\right) \cdot F([Hb], \varphi_{CO_2}, \alpha_{CO_2}, paH)$. — $\textcircled{pK_I}$ ist also gar keine Kohlensäurekonstante, sondern bestenfalls eine die Kohlensäurekonstante und die Komplexbindungskonstante einschliessende „Konstante".

Es ist hieraus ersichtlich, dass man nicht p_{KI}^* im Lösungswasser von Hämoglobinlösungen mittels gleichzeitiger Messung von paH, φ_{CO_2} und Total-CO_2 (mit bekanntem Wert von α_{CO_2}) bestimmen kann. Denn was man als ψ ansieht, ist ja $(\psi + \chi)$. Das heisst: Die so gefundenen Werte von p_{KI}^* sind (bestenfalls) um

17. $$[\log (\psi + \chi) \div \log \psi]$$

zu klein. Die Berechnungen müssen sicher noch verwickelter sein; wir kennen ja gar nicht die Änderung der „Säurenstärke" des Hämoglobins durch die Komplexbindung des CO_2 und auch nicht den Einfluss der Pufferwirkung des Hämoglobins. Die unten referierten Versuche bestätigen diese Vermutung.

Hasselbalch (1916), Warburg (1922) und van Slyke und Mitarbeiter (1923) hatten vereinzelte Versuche derartiger p_{KI}^*-Bestimmungen in Hämoglobinlösungen angestellt; sie fanden ungefähr dieselben Werte wie in Salzlösungen von denselben Ionenstärken. Der erste Versuch mit zuverlässiger Technik (s. S. 40) wurde von van Slyke, Hastings, Murray und Sendroy (1925) ausgeführt; sie fanden p_{KI}^* etwa 0,20 kleiner in Erythrocytenbrei als in proteinfreien Lösungen. Die ersten rationellen Versuche sind von Stadie und Hawes (1928) angestellt; auch sie fanden p_{KI}^* viel kleiner in Hämoglobinlösungen. Sie setzten voraus, dass CO_2 nicht komplex gebunden werde, sowie dass Hämoglobinbicarbonat total dissoziert sei. Die starke Verkleinerung des p_{KI}^* schrieben sie auf Rechnung des aktivitätshemmenden Einflusses der Hämoglobinmolekel. Sie nahmen an, dass die Aktivitätshemmung der Bicarbonationen in zwei Arten zu teilen wäre:

1. Die Aktivitätsverkleinerung, die von den Hämoglobinmolekeln ausgeübt werde, und die folgenderweise zu definieren sei

$$p_{KI}^* = p_{KI} \div py_{Total}$$

$$py_{Total} = py_{Salz}^* + py_{Hb}$$

$$py_{Hb} = py_{Total} \div py_{Salz}^*$$

wo $py_{Salz}^* = py_{Salz}$ in Hämoglobinlösungen ist.

Aus den vielen schönen Versuchen berechneten sie

$$py_{Hb} = \varrho\,[Hb]$$

d. h.: py_{Hb} ist eine geradlinige Funktion der Konzentration des Hämoglobins und nicht — wie gewöhnlich bei Aktivitätskoeffizienten — der Quadratwurzel der Konzentration.

2. Das Hämoglobin wirkt nicht bloss aktivitätsverkleinernd auf die Bicarbonationen, sondern auf alle vorhandenen Ionen. Aus den Versuchen schlossen Stadie und Hawes, dass das Wirkungsvermögen der Salze sehr stark gehemmt sei; während in proteinfreien Lösungen

$$py_{Salz} = 0{,}54\ \sqrt{\Gamma}$$

gilt (Γ = Ionenstärke pro Liter!), so fanden sie in Hämoglobinlösungen

$$py_{Salz}{}^{*} = py_{Total} \div py_{Hb}$$
$$= (0{,}54 \div \sigma\,[Hb])\ \sqrt{\Gamma}$$

wo (zum Beispiel)

$$(0{,}54 - \sigma\,[Hb]) = \begin{cases} 0{,}12 \text{ — bei [20 mM red. Hb]} \\ 0{,}33 \text{ — bei [10 mM red. Hb]} \\ 0{,}31 \text{ — bei [20 mM Hb·CO]} \\ 0{,}43 \text{ — bei [10 mM Hb·CO]} \end{cases}$$

also eine kolossale Verkleinerung des Grundwerts (0,54). Abb. 2 zeigt die von Stadie und Hawes angenommenen Variationen von $p_{K1}{}^{*}$ mit Hämoglobinkonzentration und Ionenstärke. Bei Ionenstärke = 0 sind

$p_{K1} = 6{,}33$
$p_{K1}{}^{*}\cdot 20\text{ mM}\cdot\text{red}\cdot\text{Hb} = 5{,}91$ } Dif. 0,42
$p_{K1}{}^{*}\cdot 20\text{ mM}\cdot\text{Hb}\cdot\text{CO} = 6{,}08$ } Dif. 0,25

20 mM [Hb] entspricht der Durchschnittskonzentration in Menschenerythrocyten; Hb · CO verhalte sich wie Hb · O_2. Die besprochene Verkleinerung der Salzwirkung ist direkt aus der Abbildung ersichtlich.

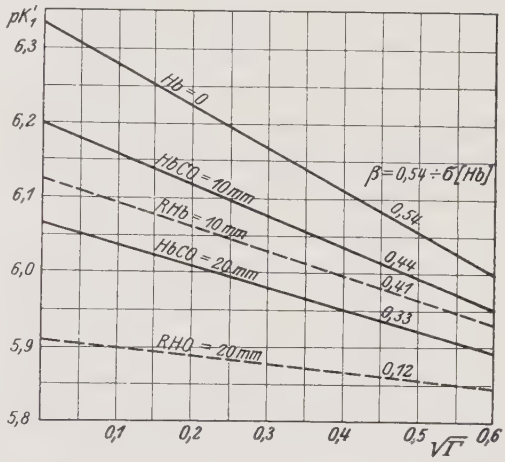

Abb. 2. Nach Stadie und Hawes' Versuchen der Messung von „$pK_1{}^{*}$ des CO_2“ in Hämoglobinlösungen.

Drei Punkte sind hier hervorzuheben:

1. Es ist schwierig zu verstehen, wie Stadie und Hawes, sowie in der letzten Publikation Stadie es als wahrscheinlich annehmen konnten, dass die Gegenwart von 20 mM reduziertes Hämoglobin eine so enorme Verkleinerung der Aktivität der Bicarbonationen zu bewerkstelligen vermöge wie bis (antilog — 0,42) x 100 = 38% des Wertes bei Hämoglobinkonzentration = 0. Das würde (falls Extrapolation zulässig wäre) der Wirkung einer Ionenstärke von 0,83 entsprechen, oder — da

$$\Gamma = \tfrac{1}{2}\,\Sigma\,(\text{Valenz})^2 \cdot [\text{Konzentration}]$$

— es würde notwendig machen, dass man den Hämoglobinmolekeln den Aktivitätseinfluss von Ionen mit einer Durchschnittsvalenz von 9,4 zuschriebe. Stadie meint selbst (S. 312), dass die Hämoglobinmolekel nur wie monovalente Ionen wirken, und führt als Stütze dieser Anschauung einen Versuch an, wo py_{Hb} sich nicht änderte, trotzdem das Hämoglobin bei Basenzusatz viel elektronegativer geworden war. Wenn aber diese letztgenannte Annahme

richtig ist (und das glaube ich mit Stadie), dann muss Stadies erstzitierte Annahme unrichtig sein. In derselben Richtung deutet das Verhalten des Hb·CO; hier würde die „Aktivitätshemmung" nur py = 0,25 entsprechen, oder 56% vom Wert in hämoglobinfreier Lösung; wie oben umgerechnet, entspricht das der Wirkung einer Ionenstärke von 0,68, oder man müsste den Hämoglobinmolekeln eine Durchschnittsvalenz von 8,2 beilegen. Es ist doch als ganz unwahrscheinlich anzusehen, dass die Einführung von einem Molekel CO in das Hämoglobinmolekel eine so enorme Änderung des „Valenz"- oder „Aktivitätseinflusses" herbeiführe, während die Elektronegativierung durch Basenzusatz keine merkbare Wirkung ausübt.

Stadie (S. 314) sieht auch ganz klar die Möglichkeit einer speziellen Bindung von Kohlensäure an Hämoglobin und schreibt, dass seine Berechnungen in dem Fall teilweise oder vollständig modifiziert werden müssen.

Meines Erachtens ist diese letzte Möglichkeit der einzige natürliche Schluss aus Stadie und Hawes ausgezeichneten Versuchen, und ich könnte mir nicht eine bessere Bestätigung meiner Nachweise und Theorie des Carbhämoglobins wünschen.

2. Der von Stadie und Hawes nachgewiesene Unterschied zwischen den „Aktivitätseinflüssen" von reduziertem und Kohlenoxydhämoglobin kann ich deshalb auch nur als eine vorzügliche Bestätigung meiner Versuche auffassen, da ich den Unterschied zwischen den Komplexbindungsvermögen von reduziertem und Oxyhämoglobin demonstriert habe.

3. Die von Stadie und Hawes nachgewiesene „Hemmung" des aktivitätsvermindernden Einflusses der vorhandenen Ionenstärke (d. h. der Chlor- und Natriumionen) kann meiner Meinung nach wegen derselben Betrachtungen wie sub (1) auch nur in der Weise erklärt werden, dass ein Teil der genannten Ionen am Hämoglobin komplex gebunden ist; dieses Verhalten ist somit als eine Bestätigung meines Nachweises dieser Komplexbindungen zu rechnen.

Da Stadie und Hawes nicht die Aktivitäten der drei Ionenarten direkt gemessen haben, ist es leider unmöglich, die Komplexbindungsgrade aus ihren Versuchen zu berechnen. Das einzige, was man feststellen kann, ist, dass ihr Berechnungsmodus nicht haltbar ist; aus Abb. 2 (nach ihrer Abb. 14 wiedergegeben) geht hervor, dass sie meinen

$$py_{\text{Salz} \cdot \text{Wasser}} = 0{,}54\ \sqrt{I}$$
$$py_{\text{Salz} \cdot 20\ \text{mM Hb} \cdot \text{CO}} = 0{,}31\ \sqrt{I}$$
$$py_{\text{Salz} \cdot 20\ \text{mM red. Hb}} = 0{,}12\ \sqrt{I}$$

das würde aber bedeuten, dass die Salzwirkung in den 20 mM-Lösungen von Hb · CO und reduziertem Hämoglobin nur 33 bzw. 5% der Wirkung in proteinfreien Lösungen betrüge; und das ist unmöglich.

Nach Stadie und Hawes Anschauungen würde man somit haben: 20 mM pr. Liter von Hb·CO und reduziertem Hämoglobin setzen die Aktivität

der monovalenten Bicarbonationen auf 56% bzw. 38% ihrer Aktivität in reinem Wasser herab, während sie die Aktivität der gleichfalls monovalenten Chlor- und Natriumionen auf 33% bzw. 5% ihrer Aktivität in reinem Wasser herabsetzen. Allein diese grosse Nichtübereinstimmung verurteilt die Hypothese von Stadie und Hawes: Die Hämoglobin-„Wirkung" kann nicht eine generelle, physikalische, elektrostatische Wirkung sein. In meinen Donnan-Versuchen habe ich dasselbe Phänomen nachgewiesen und schliesse daraus, dass Hämoglobin spezifisch auf die verschiedenen Molekülarten wirken muss, und dass diese Wirkung am wahrscheinlichsten als eine Komplexbindung zu deuten ist.

Stadie und Hawes haben versucht, alle Funktionen als geradlinige darzustellen; eine nähere Untersuchung der Punkte in ihren Abbildungen ergibt indessen, dass man ebensogut — oder besser — die meisten geraden Linien (zu mindestens auf grossen Strecken) durch gebogene Kurven ersetzen kann. Das würde auch besser sowohl mit meinen Donnan-Versuchen wie mit meinen Explosionsanalysen übereinstimmen, indem ich die Komplexbindung als recht verwickelte Funktion gefunden habe.

Wenn somit auch die ausgezeichneten Versuche von Stadie und Hawes sich nicht für eine quantitative Auswertung der vielen einzelnen Faktoren eignen, so behalten sie doch ihre entschiedene Bedeutung als qualitativer Beweis der Komplexbindung. Ferner ist Stadies Hervorheben von der Bedeutung der Dielektrizitätskonstante der Hämoglobinmolekel für die Aktivitätsverhältnisse der Lösung von grossem Wert; es liegt aber ausser dem Plan vorliegender Arbeit diese Probleme weiter zu erörtern.

IV. Einige Daten aus der physikalischen Chemie des Hämoglobins.

Es liegt in der Literatur eine Reihe von Elementaranalysen von verschiedenen Hämoglobinsorten vor; die meisten sind in den letzten Jahrzehnten des vorigen Jahrhunderts ausgeführt worden; hier werden nach Hammarsten folgende Analysen als Beispiele angeführt:

Tabelle 4.

Hämoglobin von	C	H	N	S	Fe	O	
Hund	53,85	7,32	16,17	0,39	0,43	21,84	Hoppe-Seyler
„	54,57	7,22	16,38	0,568	0,336	20,93	Jacquet
Pferd	54,87	6,97	17,31	0,650	0,470	19,73	Kossel
„	51,15	6,76	17,94	0,390	0,335	23,43	Zinoffsky
Rind	54,66	7,25	17,70	0,447	0,400	19,543	Hüfner
Schwein	54,17	7,38	16,23	0,660	0,430	21,360	Otto
„	54,71	7,38	17,43	0,479	0,399	19,602	Hüfner
Meerschweinchen	54,12	7,36	16,78	0,580	0,480	20,680	Hoppe-Seyler
Eichhörnchen	54,09	7,39	16,09	0,400	0,590	21,440	„
Gans	54,26	7,10	16,21	0,540	0,430	20,690	„
Huhn	52,47	7,19	16,45	0,857	0,335	22,500	Jacquet

Es geht aus der Tabelle hervor, dass die Analysenwerte im grossen und ganzen übereinstimmen, aber keineswegs identisch sind. Vielleicht kommen somit verschiedene Hämoglobine vor. Man muss indessen bedenken, dass weder (und besonders) die Darstellungs- noch die Analysenmethoden ideale waren. Aus dem Eisengehalt berechnete Hüfner (1907) das Molekulargewicht zu am mindesten 16,669.

Schon 1894 behauptete Hüfner, dass die Sauerstoffkapazität des Hämoglobins eine konstante sei, und zwar 1,34 cm^3 O_2 pr. g Hämoglobin, was 1 mol O_2 pr. Gramatom Fe entspricht. Demgegenüber meinte Bohr (1892 und später), dass die vielen damaligen Analysen über die Sauerstoffkapazität unter sich so wenig übereinstimmend wären, dass es sich nicht um Versuchsfehler handeln könnte, sondern Ausdruck reeller Verschiedenheiten der verschiedenen Hämoglobinpräparate sein müssten.

Die Frage wurde erst 1912 und 1913 von R. A. Peters und Burns durch eine Reihe schöner Versuche mit verbesserter Technik zugunsten der Hüfnerschen Hypothese geklärt.

Hüfner (1901) war auch der erste, der das Massenwirkungsgesetz auf die Sauerstoffbindung des Hämoglobins in Anwendung zu bringen versuchte. Schon 1890 hatte Hüfner das Gesetz für die Sauerstoffabspaltung aus Oxyhämoglobinlösungen durch Schütteln mit Stickstoff entwickelt und hatte gezeigt, dass sie nicht eine einfache chemische Reaktion, sondern aus zwei Prozessen zusammengesetzt ist: 1. HbO_2's Dissoziation in Hb und O_2 somit 2. die Verteilung des O_2 zwischen Lösung und Luftphase. Für den Prozess I gilt das Massenwirkungsgesetz

$$\frac{[HbO_2]}{[Hb][O_2]} = K$$

der Prozess II ist heterogen und folgt dem Absorptionsgesetz

$$\text{Vol. absorp. Gas} = \frac{\alpha_t \cdot \varphi_O}{760}$$

wo α_t = Bunsens Absorptionskoeffizient bei der Temperatur t, und φ_O = der Partialdruck des Sauerstoffes in der Gasphase beim Gleichgewicht. Da Bunsens Koeffizienten absolute Mengen und nicht Molekularkonzentrationen angeben, rechnete Hüfner mit gram Hämoglobin pr. Volumeneinheit.

Es seien

C_O = gelöstes HbO_2
C_R = „ Hb
$\frac{\alpha_t \cdot \varphi_O}{760}$ = „ O_2,

so bekommt man

$$\frac{C_O \cdot 760}{C_R \cdot \alpha_t \cdot \varphi_O} = K$$

oder

$$\frac{C_O}{C_R \cdot \varphi_O} = \frac{K \cdot \alpha_t}{760} = \eta$$

indem $\frac{\alpha_t}{760}$ konstant bei konstanter Temperatur ist.

Auf der Basis einer Reihe von Sättigungsversuchen (die nicht wenig hinsichtlich der Genauigkeit zu wünschen übrig lassen) bestimmte Hüfner eine „Durchschnitts"-η, trotz Abweichungen vom Mittelwerte von 40%; bei recht mangelhaften Sättigungsversuchen in Methämoglobinlösungen bestimmte er α, und da

$$\eta = \frac{K \cdot \alpha_t}{760}$$

berechnete er einen Durchschnittswert für die Affinitätskonstante K des Oxyhämoglobins. Er nahm weiter an, dass diese Affinitätskonstante eine konstante Grösse sei, und dass die Abweichungen in den Versuchen aus Variationen in α verursacht seien; mit „bekannten" Werten für η und „bekanntem" Wert für K berechnete er somit die Variationen von α zu 0,010—0,018, was er sich als ganz wahrscheinlich vorstellte.

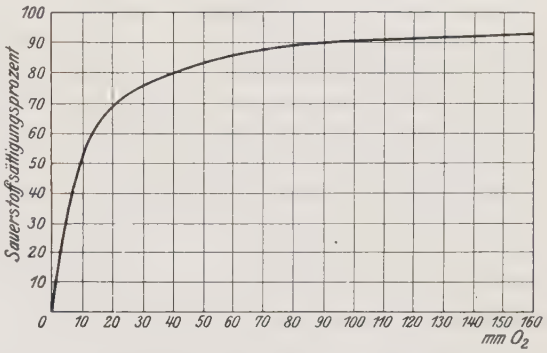

Abb. 3. Nach Hüfners rechtwinkeliger Hyperbel für die Dissoziationskurve des Oxyhämoglobins.

Ist x = das Dissoziationsprozent des HbO_2 und wird mit dem Durchschnittswert von η (= 0,11) gerechnet, dann sollte man aus der Gleichung

$$\frac{100 - x}{x \cdot \varphi_O} = \eta = 0{,}11$$

den Sättigungsgrad einer Hämoglobinlösung oder eines Blutes bei variierten Sauerstoffdrucken berechnen können; die Gleichung ist die Formel einer rechtwinkeligen Hyperbel (Abb. 3).

Während der theoretische Gedankengang Hüfners hinsichtlich der Anwendung des Massenwirkungsgesetzes korrekt zu sein scheint, war seine experimentelle Verifikation nicht ausreichend.

Die ersten guten Versuche über die Sauerstoffbindung des Hämoglobins mit einer zuverlässigen Technik [Kroghs (1904)] wurden von Bohr, Hasselbalch und Krogh (1904) veröffentlicht; sie massen den Sauerstoffsättigungsgrad des Blutes bei variierten O_2- und CO_2-Drucken und zeigten, dass die Kurven nicht rechtwinkelige Hyperbeln sind, dass CO_2 den O_2 aus dem Hämoglobin (bei O_2-Drucken unter etwa 100 mm Hg) treibt, um so mehr je höher der CO_2-Druck ist, dass ferner der Prozess reversibel ist, indem die Kurve zurück zur Norm kehrt, wenn das CO_2 beseitigt wird (Abb. 4).

Die meisten von Bohrs Ansichten über das Hämoglobin müssen wir heute ausser Acht lassen, da sie auf fehlerhafte Versuche gegründet waren; nur seine Theorie der Sauerstoffbindung des Hämoglobins (1904) wird hier nach seinem Aufsatz in Nagels Handbuch (1909) wiedergegeben.

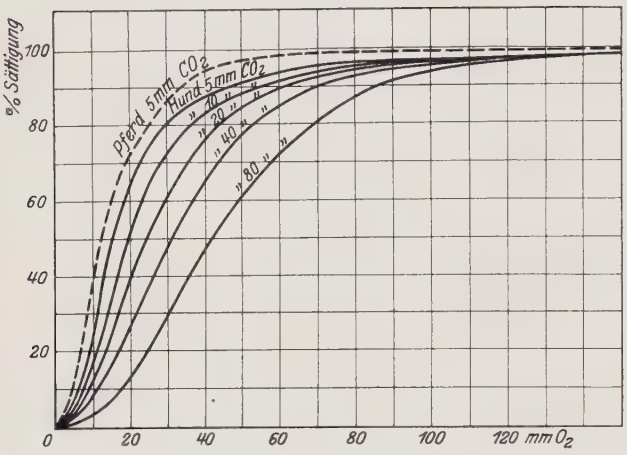

Abb. 4. Nach Bohr, Hasselbalch und Kroghs Versuchen über die Wirkung des CO_2 auf die Dissoziation des Oxyhämoglobins.

Bohr meinte, dass das krystallisierte, freie Hämoglobin verschieden von dem in den Erythrocyten vorkommenden wäre, weshalb er zum Unterscheiden das letzte Hämochrom nannte; das Hämochrom dachte er sich aus wechselnden Mengen von Globin und Hämochromogen zusammengesetzt; die CO_2-Bindung sollte an die Basengruppen des Globins vor sich gehen, während der Sauerstoff an das eisenhaltige Hämochromogen gebunden würde. Bohr machte „die wohl unzweifelhafte Annahme", dass das Hämochrom in Globin und Hämochromogen dissoziert sei

$$\text{Hchr} \rightleftarrows \text{Hchrg} + \text{Globin}$$

Er setzte:

Der mit O_2 verb. Teil des Hchrg . . . . . $= z$
Der nicht mit O_2 verb. Teil des Hchrg . . . . . $= u$
Dissoziertes Globin = dissoziertes Hchr . . . . . $= z + u$
Nicht-dissoziiertes Hchr . . . . . $= 1 \div z : u$
Die Konzentration des Hchr = gram pr. cm^3 . . . . . $= C$
mm O_2 über der Flüssigkeit . . . . . $= x$
Der Sauerstoffabsorptionskoeffizient . . . . . $= a$

Da hat man

$$\frac{[\text{Hchrg}] \cdot [\text{Globin}]}{[\text{Hchr}]} = K_1$$

und

$$\frac{[\text{Hchrg}] \cdot [O_2]^2}{[\text{Hchrg} \cdot O_2]} = K_2$$

samt

(1) $$K_1 \cdot C \cdot (1 \div z \div u) = C \cdot u \cdot C \cdot (u + z)$$

oder

$$K_1 \cdot (1 : z \div u) = C \cdot u \cdot (u + z)$$

und

$$K_2 \cdot C \cdot z = C \cdot u \cdot \left(\frac{\alpha \cdot x}{760}\right)^2$$

Die letzte Gleichung kann umgeschrieben werden:

$$k \cdot z = u \cdot x^2$$

wo k = eine neue Konstante ist.

Also

$$u = \frac{k \cdot z}{x^2}$$

die in (1) eingesetzt

$$k c z^2 \left(1 + \frac{k}{x^2}\right) = K_1 \cdot [x^2 \cdot (1 - z) - z \cdot k]$$

gibt.

Seien ferner:

Die Menge O_2, die maximal pr. Gramm Hchr gebunden wird . . . . . = B
Die bei x mm O_2 pr. Gramm Hchr gebundene Menge O_2 . . . . . = y
dann ist

$$z = \frac{y}{B}$$

Sei endlich

$$K = \frac{k}{K_1 \cdot B}$$

kommt man zur Bohrs Gleichung für die O_2-Bindung des Hämochroms bei variierten O_2-Drucken:

$$K \cdot C \cdot y^2 \cdot \left(1 + \frac{k}{x^2}\right) = x^2 \cdot (B - y) - yk.$$

Dieselbe Gleichung gilt für die Aufnahme von CO, durch Hämochrom, nur mit anderen Konstanten.

Die Gleichung enthält zwei unbekannte (K und k), und setzt zwei Moleküle O_2 pr. Molekül Hämochrom voraus. Hierdurch wird die Bindung eine Funktion zweiten Grades der Sauerstoffkonzentration; dass die Funktion eine „exponentielle" ist, geht aus der S-Form der Kurven allein hervor; dass aber mehr als ein Grammol O_2 pr. Gramatom Fe gebunden sei, ist im Widerspruch mit allen experimentellen Tatsachen; Bohr selbst gab seine eigene Deutung der Bindung nur mit Vorbehalt, und er machte auch selbst darauf aufmerksam, dass die Hypothese über die zwei Mol O_2 pr. Eisenatom nicht mit den Versuchen von Haldane und Smith (1897) übereinstimmt; sie hatten nachgewiesen, dass die Mengen von CO und O_2, die Blut aus einer Mischung der zwei Gase aufnimmt, den Partialdrucken der zwei Gase proportional sind; nach Bohrs Theorie sollten sie den Quadraten der Drucke proportional sein, indem

$$K_O \cdot Z_O = u \times \varphi_O^2$$
$$K_{CO} \cdot Z_{CO} = u \times \varphi_{CO}^2$$

woraus

$$\frac{Z_O}{Z_{CO}} = \left(\frac{\varphi_O}{\varphi_{CO}}\right)^2 \times K$$

Eine weitere Ausarbeitung der Frage wurde von Barcroft und seinen Schülern unternommen (1909—14). Nach einer langen Reihe vergeblicher Versuche gelang es 1909 Barcroft und Camis nachzuweisen, dass die Sauerstoffdissoziationskurve dialysiertes Hämoglobin eine rechtwinkelige Hyperbel ist; 2. dass die Kurve bei Salzzusatz S-förmig wird; 3. dass dialysiertes Hämoglobin — in destilliertem Wasser + Na, K, P_2O_5, Cl und HCO_3 in denselben

Verhältnissen und Konzentrationen wie in Menschenerythrocyten gelöst — eine Dissoziationskurve von derselben Form wie Menschenblut gibt; 4. dass

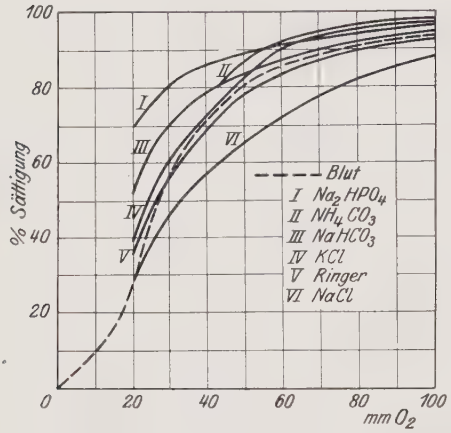

Abb. 5. Nach Barcroft und Camis' Versuchen über die Wirkung von Salzen auf die Dissoziation des Oxyhämoglobins.

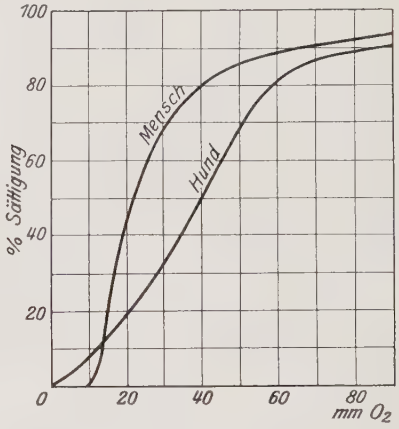

Abb. 6. Nach Barcroft und Camis' Versuchen über Herstellung von „künstlichem" Menschen- und Hundeblut.

dasselbe Hämoglobin — in destilliertem Wasser + Salzen in denselben Verhältnissen und Konzentrationen wie in Hundeerythrocyten gelöst — eine Dissoziationskurve von derselben Form wie Hundeblut gibt.

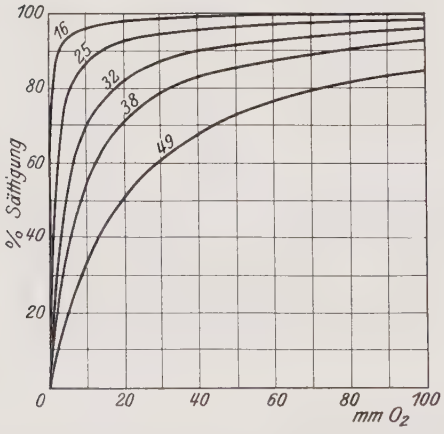

Abb. 7. Nach Barcroft und Kings Versuchen über die Wirkung der Temperatur auf die Dissoziation des Oxyhämoglobins (° C).

Barcroft und Roberts (1909) reproduzierten die rechtwinkelige Hyperbel für dialysiertes Hämoglobin und Bohrs S-förmige Kurve für äthergefälltes Hämoglobin; Barcroft und King (1909) zeigten den Einfluss der Temperatur auf die Kurve und hoben hervor, dass der grosse Temperaturkoeffizient für eine chemische Bindung des Sauerstoffes und nicht für die von W. Ostwald postulierte physikalische Adsorption spricht; sie diskutierten dabei die Einwirkung der Fiebertemperatur auf den Sauerstoffwechsel.

A. V. Hill (1910) suchte eine Formel für Barcroft und Camis Kurven zu berechnen; für dialysiertes Hämoglobin in destilliertem Wasser gilt die einfache Hüfnersche Gleichung für eine rechtwinklige Hyperbel

$$\frac{y}{100} = \frac{Kx}{1 + Kx}$$

wo y = Sauerstoffsättigungsprozent, x = mm O_2-Druck und K = eine

Konstante ist, die den Absorptionskoeffizient des Sauerstoffs bei der gegebenen Temperatur einschliesst; die Gleichung entspricht dem Prozess

$$Hb + O_2 \rightleftarrows HbO_2$$

und der Massenwirkungsgleichung

$$\frac{[Hb] \cdot [O_2]}{[HbO_2]} = K$$

Hill zeigte, dass eine Formel wie

$$\frac{y}{100} = \frac{K_1 x^n}{1 + K_1 x^n}$$

allgemein für Barcroft und Camis Kurven über die Sauerstoffbindung von Hämoglobin in Salzlösungen anzupassen ist; die Konstante n variiert zwischen 1 und 3; bei Salzkompositionen wie im Blut war sie etwa 2,5. Für den physikalischen Inhalt dieser Formel schlug Hill die folgende Theorie vor: In destilliertem Wasser gelöst sind die Hämoglobinmolekel als Einzelmolekel vorhanden; in Gegenwart von Salzen aber aggregieren sie, und n bedeutet die Mittelanzahl von Hämoglobinmolekeln pr. Aggregat. Die entsprechende Massenwirkungsgleichung lautet

$$\frac{[Hb_n] \cdot [O_2]^n}{[(HbO_2)_n]} = K_{Hill}$$

Man bemerkt, dass die Hillsche Formel von demselben Typus ist wie die von W. Ostwald (1908) angewandte (experimentelle) Schmidt-Freundlichsche Adsorptionsisotherme

$$\frac{x}{a} = K \cdot O^m$$

Auf eine chemische Bindung deuten indessen — ausser dem grossen Temperaturkoeffizient ($q_{10} = 3{,}7$) — Peters und Burns Nachweis an konstanten Sauerstoffkapazität und Reichert und Browns (1909) krystallographische Untersuchungen, die Unterschiede in der Krystallstruktur von Hb, HbO_2 und $Hb \cdot CO$ zeigten.

1914 wiesen Peters und Barcroft aus Sauerstoffsättigungsversuchen mit Blut bei verschiedenen CO_2-Drucken nach, dass das Verhältnis zwischen der Wasserstoffionenkonzentration und der Sauerstoffaffinitätskonstante des Hämoglobins konstant ist; in einem Koordinationssystem mit dem p_H auf der einen und pK_{Hill} auf der anderen Achse abgetragen ist pK_{Hill} eine Gerade; n in Hills Formel erschien konstant = 2,5. Demgegenüber fanden Barcroft und Means 1914 in Versuchen mit dialysiertem Hämoglobin, dass n von 1 bei 0 mm CO_2—2,7 bei 67 mm CO_2 stieg; es war nicht möglich, eine einfache Formel für die Abhängigkeit des n von dem CO_2-Druck oder p_H abzuleiten. Ich lege grosses Gewicht auf diese Wirkung des CO_2; sie scheint mir meine Hypothese der Komplexbindung des CO_2 gut zu stützen.

Im selben Jahr veröffentlichten Christiansen, Douglas und Haldane eine Reihe von Untersuchungen mit verbesserter Technik, wo gezeigt wurde, dass oxydiertes Blut beträchtlich weniger CO_2 als reduziertes Blut aufnimmt (Abb. 8).

Barcroft und Hill (1910) massen die Reduktionsgeschwindigkeit von HbO_2, wenn durch eine Oxyhämoglobinlösung N_2 durchgeblasen wird. In zwei Versuchsreihen mit dialysiertem Hämoglobin bestimmten sie ferner die Affinitätskonstante bei zwei Temperaturen, und aus van't Hoffs Isochore

$$\frac{K_1}{K_2} = e^{\frac{q}{2}\frac{T_1 - T_2}{T_1 \cdot T_2}}$$

berechneten sie

$$q = 28{,}000 \text{ Kal}$$

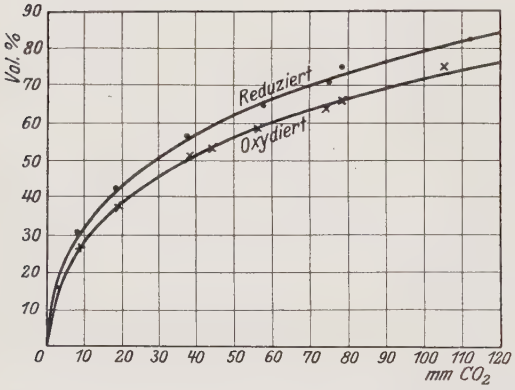

Abb. 8. Nach Christiansen, Douglas und Haldanes Versuchen über die Wirkung der Oxydation auf die CO_2-Aufnahme von Hämoglobinlösungen.

Es sei H = die Wärmeabgabe, wenn 1 g Hämoglobin sich mit O_2 verbindet, und q = die grammolekulare Reaktionswärme, dann haben wir das Molekulargewicht des Hämoglobins $= \frac{q}{H}$. Sie massen H in einem einfachen Kalorimeter in 3 Versuchen und fanden H = 1,85 Kal, woraus das Molekulargewicht des Hämoglobins $= \frac{q}{H} = \frac{28{,}000}{1{,}85} = 15{,}200$. Das stimmt schön mit dem Hüfnerschen Wert aus Eisenanalysen 16,669 und scheint also dahin zu deuten, dass die Hämoglobinmolekel in destilliertem Wasser als Einzelmolekel vorkommen. Schon vor 1910 lagen einige Versuche über Molekulargewichtsbestimmungen des Hämoglobins vor; sie waren alle aus osmotischen Messungen berechnet; in dieser Weise fanden Reid (1905) etwa 49000, Hüfner und Gansser (1907) 15000—17000 und Roaf (1909) etwa 30000 für „reines" Hämoglobin in destilliertem Wasser und Roaf ferner 32000 in Lösungen mit 0,04 n $NaHCO_3$ samt 14000 in Lösungen mit 0,04 n Na_2CO_3. Später hat Adair (1924) den osmotischen Druck von Hämoglobin in Lösungen mit 0,1 n KCl + 0,066 m Na_2HPO_4 ($p_H = 8$) gemessen; umgerechnet würden diese Versuche auf ein Molekulargewicht von etwa 67000 hinweisen. 1925 mass Adair den osmotischen Druck von dialysiertem Hämoglobin und fand auch hier Werte, die einem Molekulargewicht von etwa 66000 entsprechen würden. Alle diese osmotischen Bestimmungen sagen aber meines Erachtens nur wenig; denn der osmotische Druck ist ja eine verwickelte Funktion des Proteingehaltes, der Wasserstoff- und Salzionenaktivitäten usw.; ferner treten Donnan-Effekte ein, und all diese Phänomenen sind nicht oder nicht genügend in den besprochenen Versuchen berücksichtigt.

1926 haben Svedberg und Fåhraeus das Molekulargewicht von Hämoglobin zu 58 000 à 76 000 berechnet, auf der Grundlage von Versuchen mit Svedbergs (1923) Centrifugalmethode. Es ist schwierig zu beurteilen, ob die für einfache Sole korrekten Svedbergschen Kalküle auch für Protein-Amphoionen haltbar sind; die interionischen elektrischen Kräfte müssen sich aller Wahrscheinlichkeit nach während der Zentrifugierung in derselben Weise geltend machen wie — mutatis mutandis — in einem Donnan-Versuch, und die Wasserstoff- und Salzionenaktivitäten müssen deshalb auch hier von grosser Bedeutung sein; in Svedberg und Fåhraeus Versuchen ist aber keine Rücksicht auf diese Faktoren genommen.

Hills thermochemische Berechnungen des Molekulargewichtes scheinen mir bis heute die plausibelsten zu sein. Die Berechnungen von Barcroft und Hill sind aber auch nicht einwandfrei; denn mit der Temperatur ändern sich ausser K_{Hill} auch die Säure- und Basen-Dissoziationskonstanten, sowohl von dem Eiweissstoff als den diffusiblen Elektrolyten; hierbei ändert sich weiter p_H. — Brown und Hill (1923) haben ihre Aufmerksamkeit auf diese Punkte gelenkt; sie massen mit verfeinerter Technik K_{Hill} und die rohe Wärmetönung der Oxydation von defibriniertem Blut bei verschiedenen Temperaturen, berechneten die Lösungswärme bzw. Dissoziationswärme der verschiedenen Komponenten der Prozesse und kalkulierten danach die reine Oxydationswärme des Hämoglobins. Es ergab sich, dass n, die „Aggregationszahl", im Blut gleich 2,12 mittels dieser kalorimetrischen Versuche gefunden wurde, während sie gleich 2,30 mittels Hills Formel aus der Dissoziationskurve berechnet war. Das ist eine so gute Übereinstimmung, wie sie nur zu verlangen ist. Aus einem noch nicht aufgeklärten Grund ist die rohe Wärmetönung im Blut viel geringer als in dialysierten Hämoglobinlösungen.

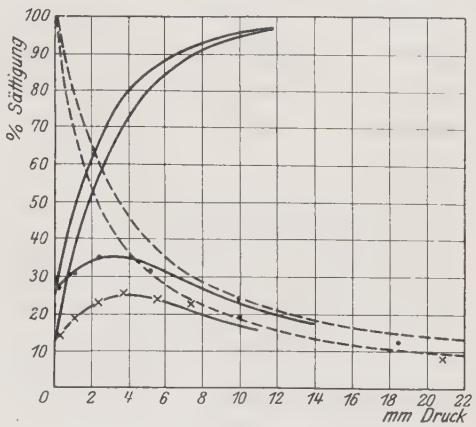

Abb. 9. Nach Douglas, Haldane und Haldanes Versuchen über die Wechselwirkung von CO und O_2 dem Hämoglobin gegenüber.

Die gestrichelten Kurven zeigen die rechtwinkeligen Hyperbeln, die man erhält, falls der CO-Druck gross genug zu voller Sättigung bei O_2-Druck = 0 ist. Die voll aufgezogenen Kurven mit den Marken zeigen den CO-Sättigungsgrad, falls der CO-Druck zu klein zu voller Sättigung bei O_2-Druck = 0 sei.

Hills einfache Aggregationshypothese vermag in befriedigender Weise die Reaktionen zwischen Hb und O_2, sowie zwischen Hb und CO zu erklären; sie bestätigt sich dagegen nicht gegenüber dem Verhalten des Hämoglobins gegen Mischungen der zwei Gase.

Douglas, Haldane und Haldane (1912) bestätigten Haldane und Smiths (1896) Nachweis, dass Hb die zwei Gase ihren Partialdrucken

proportional aufnimmt, wenn sie in genügenden Mengen zu voller Sättigung vorhanden sind; sie zeigten ferner, dass n in Hills Formel denselben Wert für O_2 und CO in einem gegebenen Blut hat, und dass nur die Gleichgewichtskonstanten verschieden sind; sei $Z = Hb_n \cdot CO_n$ würde man eine den S-förmigen Dissoziationskurven entsprechende Formel

$$Z = \frac{K_1/K\left(\frac{CO}{O_2}\right)^n}{1+K_1/K\left(\frac{CO}{O_2}\right)^n}$$

erhalten. Die Versuche gaben indessen eine einfache Formel

$$Z = \frac{K_1/K\frac{CO}{O_2}}{1+K_1/K\frac{CO}{O_2}}$$

die also rechtwinkeligen Hyperbeln und nicht S-förmigen, „exponentiellen" Dissoziationskurven entspricht.

In Versuchen mit Mischungen von $O_2 + CO$ in Mengen, die nicht zu voller Sättigung des Hämoglobins genügend sind, zeigten Douglas, Haldane und Haldane weiter, dass die CO-Aufnahme nicht dem O_2-Druck umgekehrt proportional ist, sondern ein Maximum bei einem bestimmten O_2-Druck hat.

Abb. 9 gibt einen der Versuche wieder.

Douglas, Haldane und Haldane versuchten eine Hilfshypothese aufzustellen; sie nahmen an, dass Hb-Molekel für sich aggregieren, während HbO_2- und Hb · CO-Molekel teils jede für sich teils mit einander (und mit gleich grossen Affinitäten) aggregieren.

$$\begin{aligned}
Hb + Hb &\rightleftarrows (Hb)_2 && \text{mit } K_{Hb_2}\\
Hb + Hb + \ldots\ldots &\rightleftarrows (Hb)_n && \text{mit } K_{Hbn}\\
Hb\cdot O_2 + Hb\cdot O_2 &\rightleftarrows (Hb\cdot O_2)_2 &&\\
Hb\cdot CO + Hb\cdot CO &\rightleftarrows (Hb\cdot CO)_2 && \text{mit } K_x\\
Hb\cdot O_2 + Hb\cdot CO &\rightleftarrows (Hb\cdot O_2\cdot Hb\cdot CO) &&\\
Hb\cdot O_2 + Hb\cdot CO + Hb\cdot O_2 + \ldots\ldots &\rightleftarrows (Hb\cdot x)_n && \text{mit } K_{nx}
\end{aligned}$$

Wird angenommen, dass die Hb-Molekel viel stärker als die Hb · O_2- und Hb · CO-Molekel aggregiert seien, sowie dass die aggregierten Molekel nicht Gas aufnehmen bzw. abgeben könnten, dann könnte man eine Reaktionsformel mit 3 unbekannten Konstanten aufstellen, die an die Versuchsergebnisse anzupassen ist.

Hill (1921) suchte Douglas, Haldane und Haldanes Versuche durch eine Wiederbelebung von Bohrs Hypothese über die Dissoziation von Hämoglobin in Globin und Hämochromogen zu erklären; (wie schon Douglas, Haldane und Haldane hervorgehoben hatten, ist jedoch die Existenz von freiem Hämochromogen im Blut nach unseren Kenntnissen von diesem Stoff ziemlich unwahrscheinlich). Hill meinte, dass das Gas nur mit den abdissozierten freien Hämochromogenmolekeln reagiert, und dass diese nicht (oder

sehr wenig) von den Salzen beeinflusst seien; die Salzwirkung werde nur auf die Proteinpartikeln ausgeübt.

Hill gab schliesslich eine Formel für die „Dissoziations"-, die Gasbindungs- und die Säuregleichgewichte mit 4 unbekannten Konstanten, die im Einklang mit allen experimentellen Ergebnissen zu bringen wäre. Hill schrieb (S. 580): „. . . . . Let us assume (further) that in the presence of salts the osmotic pressure of the complex Hb, and of the simple protein (globin) is reduced to 1/n of its value calculated on the assumption, that one molecule of hemoglobin contains one atom of iron. This assumption, as will be shown in a forthcoming paper, can be verified experimentally. It is not necessary to assume, that this reduction of osmotic pressure is due to aggregation of the molecules, as was previously done [Hill (1910)]. Any cause whatever which reduces the osmotic pressure will give an S-shaped dissociation curve, as can be shown by rigid thermodynamic reasoning."

Das ist kaum richtig; denn die Reaktionsordnung ist von der Anzahl der Komponenten der Reaktion und nicht von ihrer Aktivität abhängig; das allgemeine Massenwirkungsgesetz bei unendlicher Verdünnung lautet

$$\frac{c_A^a \cdot c_B^b \cdot c_D^d - - -}{c_M^m \cdot c_N^n \cdot c_O^o - - -} = \text{Konstante}$$

für die Reaktion

$$ac_A \cdot bc_B \cdot dc_D - - - \rightleftarrows mc_M \cdot nc_N \cdot oc_O - - -$$

wo c = Konzentration, grosse Buchstaben = Molekularten und kleine Buchstaben = Anzahl von denjenigen Molekeln, die in die Reaktion hineingeht.

Es sei jetzt die Aktivität (und also auch der osmotische Druck) eines oder mehrerer Komponente durch Salzwirkung oder anderswie herabgesetzt; bezeichnen wir die Aktivitätskoeffiziente mit griechischen Buchstaben, so bekommen wir

$$\frac{\alpha^a \cdot c_A^a \cdot \beta^b c_B^b \cdot \delta^d c_D^d - - -}{\mu^m c_M^m \cdot \nu^n c_N^n \cdot \omega^o c_O^o - - -} = \text{Konstante}$$

und

$$\frac{c_A^a \cdot c_B^b \cdot c_D^d - - -}{c_M^m \cdot c_N^n \cdot c_O^o - - -} = \frac{\mu^m \cdot \nu^n \cdot \omega^o - - -}{\alpha^a \cdot \beta^b \cdot \delta^d - - -} \cdot \text{Konstante} = \text{Konstante II.}$$

Also:

Durch die Herabsetzung der Aktivität (und des osmotischen Druckes) werden die Reaktionsgeschwindigkeiten und damit (vielleicht) die Gleichgewichtskonstante geändert; die Reaktionsordnung bleibt aber dieselbe.

Die S-förmige Kurve stellt indessen eine ‚exponentielle" Funktion dar; und nachdem wir uns nicht die Sauerstoffatome gesplittert denken können, müssen wir — so weit ich sehen kann — die eine oder die andere Art von „Aggregation" der Hämoglobinmolekeln annehmen; die Mechanik der Reaktion

in ihren Einzelheiten ist jedoch noch nicht als festgestellt anzusehen. Adair (1925) hat eine andere Erklärung versucht; wie oben besprochen fand er, dass das Hämoglobin in sowohl salzhaltigem als auch in salzfreiem Wasser einen osmotischen Druck ausübe, der einem Eisengehalt von vier Atomen pro Hämoglobinmolekel entspreche; setze man voraus, 1. dass ein solches Hämoglobinmolekel sich mit einem, zwei, drei oder vier O_2-Molekeln verbinden kann [$Hb \cdot O_2 — Hb \cdot (O_2)_2 — Hb \cdot (O_2)_3 — Hb \cdot (O_2)_4$], und 2. dass die Affinitäten für die Bildungen dieser Verbindungen nicht gleich gross sind, kann man einen Hillschen Gleichgewichtsausdruck mit n zwischen 1 und 4 erhalten.

Hartridge und Roughton haben in ihren musterhaften Untersuchungen (1924—27) über die Reduktions- und Oxydationsgeschwindigkeiten des Hämoglobins bewiesen, dass die O_2-Dissoziationskurven von sehr verdünnten Hämoglobinlösungen trotz Gegenwart von Salz beinahe rechtwinkelige Hyperbeln sind; in sehr verdünnten Hämoglobinlösungen finde somit keine Aggregation statt. Hartridge und Roughton zeigten ferner, dass die Reduktion von Oxyhämoglobin monomolekular und die Oxydation von Hämoglobin bimolekular verläuft. Die Wasserstoffionenaktivität und die Temperatur üben einen grossen Einfluss auf die Reduktionsgeschwindigkeit aus, haben dagegen nur geringfügigen Einfluss auf die Oxydationsgeschwindigkeit. Die Variation der Salzkonzentrationen hatte keine Wirkung auf jede der Geschwindigkeiten (die Hämoglobinkonzentrationen in den Versuchen waren aber sehr klein). Zwischen Sättigungs-Gleichgewichts-Versuchen und Geschwindigkeits-Versuchen fanden sie gutes Übereinstimmen. Die absoluten Geschwindigkeiten waren sehr klein, zwischen 0,01 und 0,001 Sekunde. Die genauen Messungen von diesen verschwindend kleinen Grössen sind die ersten schönen Resultate von ihrer genialen Technik.

Der Sauerstoff geht im Blut nur mit dem Hämoglobin eine chemische Verbindung ein; in O_2-Sättigungsversuchen ist es daher verhältnismässig leicht, die Oxydation zu untersuchen.

Meinem Nachweise zufolge geht auch das Kohlendioxyd eine spezifische Verbindung mit dem Hämoglobin ein; der Komplexbindungsgrad des CO_2 ist aber viel schwieriger zu messen, weil das CO_2 ausserdem mit dem Wasser Kohlensäure (H_2CO_3) und somit Bicarbonat (HCO'_3) bildet.

Die oben erörterten Ergebnisse und theoretischen Überlegungen aus der Oxydationschemie des Hämoglobins warnen vor zu weittragenden Hypothesen hinsichtlich der genaueren Mechanik der CO_2-Komplexbindung.

*

* *

Die ersten Jahre nach Hasselbalchs (1916) Veröffentlichung seiner Methode sammelte sich das Hauptinteresse in Bestimmungen von p_H und Total-CO_2 im Blute von Gesunden und Kranken. Eine erschöpfende Übersicht

aller bisherigen Daten gab Warburg (1922), sowie eine kritische Analyse der verwickelten Verhältnisse in den zwei zweiphasigen Systemen im Blut: Serum und Erythrocyten. Warburg führte die Aktivitätstheorie in die Biologie ein; hier und in der sehr nötigen kritischen Darstellung liegt sein grosses Verdienst.

1917 verifizierte Milroy Hasselbalchs (1916) Nachweis, dass Plasma ein ungefähr so grosses Puffervermögen wie eine 0,02 m $NaHCO_3$-Lösung besitzt, während sowohl dialysierte als nicht-dialysierte Erythrocyten einen viel grösseren Pufferinhalt haben; der Puffer ist also im Hämoglobin zu finden, und der Transport des CO_2 mit dem Blut muss deshalb mittels der Erythrocyten stattfinden.

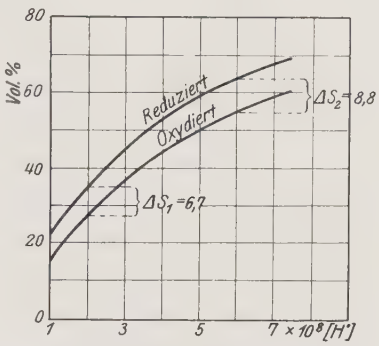

Abb. 10. Nach J. L. Hendersons Kurven zu den Versuchen von Christiansen, Douglas und Haldane (vgl. Abb. 8).

1920 nahm J. L. Henderson die Frage der Wechselwirkung des CO_2 und O_2 dem Hämoglobin gegenüber der theoretischen Behandlung auf; er benutzte den Versuch von Christiansen, Douglas und Haldane (1914) (Abb. 10) als Ausgangspunkt. Falls das Blut bei konstanter Wasserstoffionenkonzentration (= isohydrisch) aus total reduziertem in den total oxydierten Zustand übergeht, geben die Ordinatendifferenzen zwischen den zwei Kurven die Menge Base an, die $Hb \cdot O_2$ von H_2CO_3 nimmt, weil es eine stärkere Säure als Hb ist. Henderson nahm an, dass Haldanes Blut 18 Vol.-% O_2 und auch 18 Vol.-% CO_2 band, eine Annahme, die sicher nicht richtig ist. Seien S = gebundene CO_2 und B = monovalente Base, so hat man

$$K_{Hb\text{-Säure}} = K_R = [H^{\cdot}] \cdot \frac{[B \cdot Hb]}{[H \cdot Hb]} = [H^{\cdot}] \cdot \frac{S}{18 - S}$$

$$K_{Hb \cdot O_2\text{-Säure}} = K_O = [H^{\cdot}] \cdot \frac{[B \cdot HbO_2]}{[H \cdot HbO_2]} = [H^{\cdot}] \frac{S + \triangle S}{18 \div S \div \triangle S}$$

indem $\triangle S$ = Base, die von H_2CO_3 bei der Oxydation genommen wird. Es sei bemerkt, dass Henderson Hb und $Hb \cdot O_2$ als monovalente Säuren schrieb; das bedeutet nicht, dass Henderson Hämoglobin und Oxyhämoglobin als Säuren mit nur einer Puffersäuregruppe auffasste, sondern bloss dass er es als wahrscheinlich ansah, dass nur eine Puffersäuregruppe im Hämoglobin die Affinitätskonstante bei der Oxydation änderte, und er meinte, dass diese Gruppe in oder in nächster Nähe des Hämochromogenteils zu finden sei.

Werden die in Abb. 10 bezeichneten Wasserstoffionenkonzentrationen gewählt, so erhält man:

$$\text{Bei } [H^{\cdot}] = 2 \times 10^{-8} \text{ — — } \triangle S_1 = 6{,}7$$
$$\text{Bei } [H^{\cdot}] = 6 \times 10^{-8} \text{ — — } \triangle S_2 = 8{,}8$$

und

$$S_1 = \frac{27\,S_2}{9 + S_2}$$

$$\frac{S_1 + 6{,}7}{11{,}3 - S_1} = \frac{3\,S_2 + 26{,}4}{9{,}2 - S_2}$$

woraus

$$S_1 = 9{,}64$$
$$S_2 = 5{,}00$$

ferner

$$K_R = 2{,}3 \times 10^{-8}$$
$$K_O = 2 \times 10^{-7}$$

Henderson hob hervor, dass die damals zur Verfügung stehenden experimentellen Daten keine genaue Berechnung erlaubten; er wünschte nur das Prinzip zu zeigen.

In den Jahren 1920—25 haben van Slyke und seine vielen Mitarbeiter in ausgiebigen Versuchsreihen das Hämoglobin unter dem von Henderson angegebenen Gesichtswinkel untersucht.

Als Einleitung gab van Slyke eine klare theoretische Darstellung von der Berechnung der Puffergrösse des Hämoglobins mittels Titrierung mit CO_2.

Die Puffereinheit ist β

$$\beta = \frac{d\,B}{d\,pH}$$

wo B = zugefügte, monovalente, starke Base, in Mol gemessen. β ist positiv beim Zusatz starker Base ($+ d\,B$), negativ beim Zusatz starker Säure ($\div d\,B$).

Seien C = Totalkonzentration einer schwachen Säure

K_A = Die Dissoziationskonstante der schwachen Säure bei gegebener Ionenstärke,

so erhält man

$$K_A = \frac{[H^\cdot] \cdot B}{C \div B}$$

und

1. $$B = \frac{K_A \cdot C}{K_A + [H^\cdot]}$$

Da ferner allgemein

$$d\ln x = \frac{dx}{x};\ d\log x = 0{,}4343\frac{dx}{x},$$

so haben wir

$$d\,p_H = \div 0{,}4343\frac{d[H^\cdot]}{[H^\cdot]}$$

und

2. $$\frac{d\,B}{d\,p_H} = \div \frac{[H^\cdot]}{0{,}4343} \cdot \frac{d\,B}{d\,[H^\cdot]} = \div 2{,}3 \cdot [H^\cdot]\frac{d\,B}{d\,[H^\cdot]}$$

Differenzieren wir (1) nach $[H^\cdot]$

$$\frac{d\,B}{d\,[H^\cdot]} = \frac{K_A \cdot C}{(K_A + [H^\cdot])^2}$$

und multiplizieren mit $\div 2{,}3 \cdot [H^\cdot]$ [cf. (2)], so erhalten wir

$$\beta = \frac{d\,B}{d\,p_H} = \frac{2{,}3 \cdot K_A \cdot [H^\cdot] \cdot C}{(K_A + [H^\cdot])^2}$$

sowie für den molekularen Pufferwert, β_M

$$\beta_M = \frac{\beta}{C} = \frac{2{,}3 \cdot K_A \cdot [H^\cdot]}{(K_A + [H^\cdot])^2}$$

β_M hat ein Maximum bei $K_A = [H^+]$, was mittels Differenziation zu verifizieren ist; hier ist

$$\beta_M = \frac{2,3}{4} = 0,575$$

(s. S. 37) und

$$C = \frac{\beta}{\beta_M} = \frac{\beta}{0,575}$$

Bei anderen Wasserstoffionenkonzentrationen ist β_M:

Bei p_H	$\beta_M = \left\{ \begin{matrix} \% \text{ der maximalen} \\ \text{Puffergrösse} \end{matrix} \right.$
$p_H = pK$	100 %
$p_H = pK \pm 1$	33 %
$p_H = pK \pm 2$	4 %
$p_H = pK \pm 3$	0,4 %
$p_H = pK \pm 4$	0,04 %

Für schwache Basen gilt entsprechend (indem man $[OH']$ mit $\frac{K_w}{[H^+]}$ und $\frac{K_w}{K_b} = K_B$ ersetzt)

$$\beta = \frac{d\,B}{d\,p_H} = 2,3\,\frac{K_B \cdot [H^+] \cdot C}{(K_B \cdot [H^+] + K_w)^2}$$

Enthielt die Lösung gleichzeitig mehrere schwache Säuren und Basen, dann werden die Pufferwirkungen summiert:

$$\beta = 2,3 \cdot [H^+] \left(\frac{C_1 \cdot K_{A1}}{(K_{A1} + [H^+])^2} + \frac{C_2 \cdot K_{A2}}{(K_{A2} + [H^+])^2} - - - \frac{C_S \cdot K_{AS}}{(K_{AS} + [H^+])^2} + \right.$$
$$\left. \frac{C_I \cdot K_{BI}}{(K_{BI} \cdot [H^+] + K_w)^2} + \frac{C_{II} \cdot K_{BII}}{(K_{BII} \cdot [H^+] + K_w)^2} - - - \frac{C_N \cdot K_{BN}}{(K_{BN} \cdot [H^+] + K_w)^2} \right)$$

wo S und N = die Anzahl der Säuren(-gruppen) bzw. der Basen(-gruppen).

Während die Titrierungskurve einer schwachen Säure oder Base S-förmig gekrümmt ist, wird die Kurve einer Mischung von schwachen Säuren (und/oder Basen) geradlinig auf einer langen Strecke sein, indem die einzelnen Kurven einander „überlagern", wenn nur die Dissoziationskonstanten der Säuren (und/oder Basen) einander genügend nahe liegen. Dieses gilt für Eiweissstoffe bei physiologischer Wasserstoffionenkonzentration (vgl. Abb. 1).

Bei der Berechnung der Puffer des Blutes setzte van Slyke voraus, dass nur das Bicarbonat und das Hämoglobin von Bedeutung seien, sowie dass das Hämoglobin bei der normalen Wasserstoffionenkonzentration des Blutes (p_H = etwa 7,4) nur als Säure (mit der Valenz m) dissoziert sei. Bei Änderung von p_H wechselt somit die Base zwischen HCO'_3 und $Hb^{(m')}$:

$$\beta_{Hb} = \frac{-\,d\,B \cdot HCO_3}{d\,p_H}$$

Aus seiner Übersicht der „CO_2-Carriers of the Blood" (1921) entnahm er die Zahlen für den Basenwechsel bei Änderung von p_H von 7—7,8 ($d\,p_H$ = = 0,8); $B \cdot HCO_3$ wurde mittels des Massenwirkungsausdrucks

$$p_H = pK_I^* + \log \frac{[HCO'_3]}{[CO_2]} = 6,10 + \log \frac{[HCO'_3]}{[CO_2]} \quad (38^0\ C)$$

berechnet; $B \cdot HCO_3$ sank in dem Beispiel von 28,5—12,0 Mm pro Liter ($-dB \cdot HCO_3 = 0{,}0165$). Also

$$\beta_{Hb} = \frac{-dB \cdot HCO_3}{dp_H} = \frac{0{,}0165}{0{,}8} = 0{,}0206$$

Dieser Puffer sollte somit von den Säuregruppen des Hämoglobins herrühren; denke man sich ihre pK_A in der Nachbarschaft von 7,4 liegend, so dass sie bei p_H 7,4 ihre maximale Pufferwirkung entfalteten, dann werde ihre Konzentration

$$C_{Hb\text{-Säure}} = \frac{\beta}{0{,}575} = \frac{0{,}0206}{0{,}575} = 0{,}036 \text{ normal}$$

sein, und da bei p_H 7,4 die Hälfte Säure und die Hälfte Salz sein würde, würden sie

$$\frac{0{,}036}{2} = 0{,}018 \text{ Äquivalente}$$

Base binden. Wenn man rechnet, dass ein mol Hämoglobin ein mol O_2 bindet, dann ist normales Menschenblut etwa 0,008 molar an Hämoglobin; ein Molekel Hämoglobin werde deshalb

$$\frac{0{,}036}{0{,}008} = 4{,}5 \text{ COOH-Gruppen}$$

mit pK_A bei 7,4 besitzen.

Bei p_H 7,4 beträgt der Pufferwert von Kohlensäure in normalem Blut nur

$$\beta_{H_2CO_3} = \frac{2{,}3 \cdot K_A \cdot C \cdot [H^\cdot]}{(K_A + [H^\cdot])^2} = \frac{2{,}3 \cdot 8 \cdot 10^{-7} \cdot 0{,}0205 \cdot 4 \cdot 10^{-8}}{(8 \cdot 10^{-7} + 4 \cdot 10^{-8})^2} = 0{,}0022$$

und die totale Pufferzahl des Blutes ist

$$\beta_{Total} = 0{,}0206 + 0{,}0022 = 0{,}0228$$

sowie die totale Pufferkonzentration

$$C_{Total} = 0{,}036 + 0{,}0215 = 0{,}0575 \text{ normal.}$$

Alle diese Zahlen sind grobe Annäherungen; in den folgenden Jahren brachten van Slyke und seine zahlreichen Mitarbeiter eine Reihe von Messungen an reinen Hämoglobinlösungen mit verfeinerter Technik. Das reine Hämoglobin wurde a. m. Heidelberger (1922) aus Pferdeerythrocyten hergestellt.

Da Pferdeblut gewöhnlich 15—16 Vol.-% O_2 bindet, ist sein Inhalt von Hämoglobin $\frac{15-16}{2{,}2400}$ = etwa 7 Mmol pro Liter. Diese Konzentration wurde deshalb auch in ihren Versuchen gewählt. Zu dem reinen Hämoglobin wurden 30—40 Mmol NaOH pro Liter gefügt. Die Versuche waren sehr schwierig, da das Hämoglobin schnell sein Sauerstoffbindungsvermögen einbüsste.

Sie brauchten den Wert 0,531 für $\alpha_{CO_2-38°}$, indem sie schätzungsweise aus Bohrs (1905) Wert für $\alpha_{CO_2-38} = 0{,}45$ in Erythrocytenbrei extra-

polierten; aus eigenen Versuchen berechneten sie $pK_I^* = 6{,}18$ in der genannten Flüssigkeit.

In den Experimenten wurden die CO_2- und O_2-Drucke über gegebene Volumina der Hämoglobinlösung variiert; die Drucke sowie Total-CO_2 und Total O_2 wurden volumetrisch gemessen; in reduzierten Proben wurde p_H sowohl elektro- als volumetrisch bestimmt, in oxydierten Proben nur volumetrisch. Von Hb oder HbO_2 gebundene Base wurde als Total-Base — $B \cdot HCO_3$ berechnet, da keine anderen Säuren vorhanden waren. Als Beispiel werde eine ihrer Titrierungskurven gegeben (Abb. 11). Es ist hieraus ersichtlich, dass die Neigung der Kurven (die der Ausdruck des Puffervermögens ist) ungefähr die gleiche für oxydiertes und reduziertes Hämoglobin ist; bei einem gegebenen p_H-Wert bindet indessen Hb weniger Base als HbO_2; in 3 Versuchsreihen wurde durchschnittlich $B \cdot Hb = 0{,}70 \cdot B \cdot HbO_2$ bei p_H 7,4 gefunden. Aus den Kurven wurde $\beta = \frac{-\,d\,B \cdot HCO_3}{d\,p_H}$ abgelesen, und da die Lösungen etwa 7 millimolar nach Hämoglobin waren, gab $\frac{\beta}{7}$ die millimolaren Pufferzahlen β_R und β_O für reduziertes bzw. oxydiertes Hämoglobin an. Als Durchschnittswerte wurden gefunden

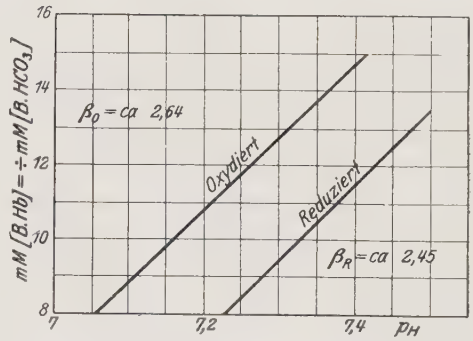

Abb. 11. Nach van Slyke, Hastings, Heidelberger und Neils CO_2-Titrierungskurven von Hämoglobin und Oxyhämoglobin.

$$\beta_R = 2{,}45\ (mM)$$
$$\beta_O = 2{,}64\ (mM)$$

woraus bei Division durch 0,575 (s. S. 35) die Anzahl der COOH-Gruppen gefunden wurden:

$$\frac{2{,}45}{0{,}575} = 4{,}3 \text{ Puffer-COOH-Gruppen in Hb}$$

$$\frac{2{,}64}{0{,}575} = 4{,}6 \quad \text{„} \quad \text{„} \quad \text{„} \quad \text{„ } HbO_2$$

wenn man rechnet, dass der ganze Puffer aus COOH-Gruppen mit pK_A = etwa 7,4 herrühre.

Da Hb und HbO_2 die β-Werte 2,45 und 2,64 haben, erhält man

$$[B \cdot Hb] = 2{,}45 \cdot [Hb] \cdot p_H - a$$
$$[B \cdot HbO_2] = 2{,}64 \cdot [HbO_2] \cdot p_H - b$$

wo a und b den isoelektrischen Punkten des reduzierten bzw. oxydierten Hämoglobins entsprechen sollten, indem hier keine Base gebunden werde. Die Punkte konnten nur mittels Extrapolation bestimmt werden:

$$a = pJ_{Hb} = 6{,}80$$
$$b = pJ_{HbO_2} = 6{,}585$$

van Slyke bemerkte indessen selbst, dass diese Werte nicht eigentliche isoelektrische Punkte, sondern nur Gleichgewichtspunkte für das gegebene System waren.

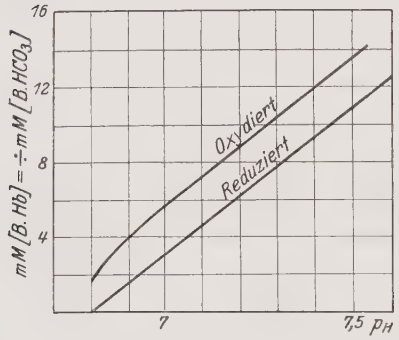

Abb. 12. Nach van Slyke, Hastings, Neil, Heidelberger und Harringtons Kurven für die Pufferwirkung von Hämoglobin und Oxyhämoglobin (mit CO_2 titriert).

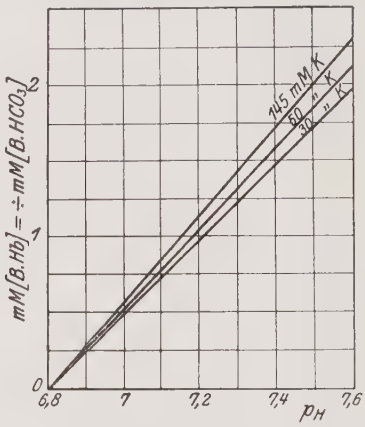

Abb. 13. Nach van Slyke, Hastings, Neil, Heidelberger und Harringtons Kurven für den Einfluss von Salzen auf die Pufferwirkung des Hämoglobins (mit CO_2 titriert).

In späteren Publikationen (Art. V und VI) berechneten sie dieselben Grössen zu

$\beta_R = 3{,}35$ und daher: 5,82 wirksame COOH-Gruppen in Hb
$\beta_O = 3{,}6$ „ „ : 6,26 „ „ „ „ HbO_2

$$pJ_{Hb} = 6{,}59 — 6{,}80$$
$$pJ_{HbO_2} = 6{,}40 — 6{,}60$$

Diese Abweichungen sind weit ausserhalb der Versuchsfehler.

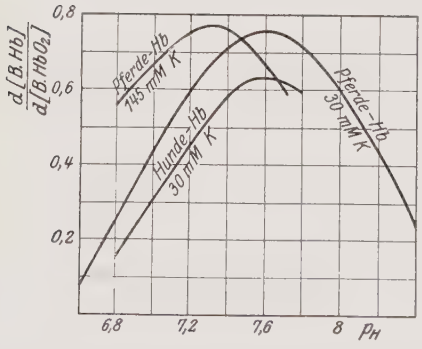

Abb. 14. Nach van Slyke, Hastings, Neil, Heidelberger und Harringtons Kurven, die zeigen, dass die Vermehrung der Basenbindungsfähigkeit des Hämoglobins bei Oxydation eine Funktion der Wasserstoff- und Salzionenkonzentrationen ist. (Die Lösungen wurden mit CO_2 titriert.)

In Artikel VI (1924) suchten sie J. L. Hendersons oben besprochene Hypothese durch genaue Messungen der zugehörigen Grössen zu verifizieren. Sie zeigten, dass reduziertes Hämoglobin dieselbe Pufferwirkung von p_H 7,6—6,8 hat, indem die Titrierungskurven hier geradlinig sind, während Oxyhämoglobin ungefähr die gleiche Pufferwirkung von p_H 7,6—6,9 und eine bedeutend grössere von p_H 6,9—6,8 hat. (Siehe Abb. 12, nach ihrer Abb. 6 wiedergegeben.) Ferner wurde gezeigt, dass die Pufferwirkung bei Salzzusatz steigt (Abb. 13). [Das stimmt mit der Aktivitätstheorie überein (cf. Linderström-Lang 1924).]

Eine Betrachtung des Quotienten

$$\left(\frac{d\,B \cdot Hb}{d\,B \cdot HbO_2}\right)_{p_H}$$

(d. h. die isohydrische Steigerung des Basenbindungsvermögens bei der Oxydation) gibt, dass diese einen Maximalwert bei einem bestimmten p_H besitzt, von wo aus sie mit fallendem und steigendem p_H sinkt. Dieses Maximum-p_H ist eine Funktion der Salzkonzentration, indem es mit steigernder Salzkonzentration sinkt: bei 30 m Äq. Kation ist es p_H 7,6, bei 50 m Äq. ist es p_H 7,4, und bei 145 m Äq. ist es p_H 7,3 (Abb. 14).

Der Quotient kann umgeschrieben werden:

$$\frac{\triangle([B \cdot Hb] + [B \cdot HbO_2])}{\triangle \text{ Oxydation}} = \frac{[B \cdot HbO_2]}{([Hb] + [HbO_2])} \cdot \frac{[B \cdot Hb]}{([Hb] + [HbO_2])} =$$

$$\left(\frac{K_{O1}}{K_{O1} + [H^{\cdot}]} - \frac{K_{R1}}{K_{R1} + [H^{\cdot}]}\right) + \left(\frac{K_{O2}}{K_{O2} + [H^{\cdot}]} - \frac{K_{R2}}{K_{R2} + [H^{\cdot}]}\right) + - - - +$$

$$\left(\frac{K_{On}}{K_{On} + [H^{\cdot}]} - \frac{K_{Rn}}{K_{Rn} + [H^{\cdot}]}\right)$$

und nimmt man mit Henderson an, dass nur eine Säuregruppe seine Stärke ändert, während alle anderen konstant bleiben, dann fallen alle Addende mit Ausnahme dieser einen weg, so dass

$$\frac{\triangle([B \cdot Hb] + [B \cdot HbO_2])}{\triangle \text{ Oxydation}} = \frac{K_O^*}{K_O^* + [H^{\cdot}]} - \frac{K_R^*}{K_R^* + [H^{\cdot}]} =$$

$$\frac{1}{1 + \frac{[H^{\cdot}]}{K_O^*}} - \frac{1}{1 + \frac{[H^{\cdot}]}{K_R^*}} = \frac{1}{1 + 10^{(pK_O^* - p_H)}} - \frac{1}{1 + 10^{(pK_R^* - p_H)}}$$

van Slyke berechnete graphisch pK_O^* und pK_R^* aus dieser letzten Gleichung (Abb. 15). In Abb. 15 sind der Ordinate entlang: Äquivalenten Base, die von der sauerstofflabilen Säuregruppe gebunden sind, während die Abszisse ($pK^* - p_H$) angibt. Als Nullpunkt ist natürlich gewählt

$$p_H = \frac{pK_O^* - pK_R^*}{2}$$

d. h. den p_H, wo der Unterschied der Basenbindung am grössten ist (= 0,73 Äquivalente), den Mittelpunkten der Titrierungskurven entsprechend. Als Durchschnitt wurde in Pferdehämoglobin in Gegenwart von 145 m Äq. Kation gefunden:

$$pK_R^* - pK_O^* = 1{,}46$$
$$pK_R^* = 7{,}30 + 0{,}73 = 8{,}03$$
$$pK_O^* = 7{,}30 - 0{,}73 = 6{,}57$$
$$K_O^* = 29 \cdot K_R^*.$$

In allen Untersuchungen wurde der „Basenzusatz" zu dem Hämoglobin als die Menge Base berechnet, die beim CO_2-Druck-Wechsel vom Bicarbonat

genommen wäre, und sie wurde mittels des Massenwirkungsgesetzes kalkuliert. Die Lösungen sind also mit CO_2 titriert, und die Resultate sind berechnet, als ob die Titrierungen mit Kohlensäure stattgefunden hätten. Erst 1925 (s. S. 18) entdeckten van Slyke und seine Mitarbeiter, dass pK_I^* des CO_2 in Hämoglobinlösungen viel kleiner als in Salzlösungen von derselben Ionenstärke ist. Wie im zweiten Kapitel auseinandergesetzt, sind derartige pK_I^*-Bestimmungen aber nicht richtig.

Da ein Teil des gebundenen CO_2 am Hämoglobin komplex gebunden ist, sind alle die Zahlen in den Berechnungen von Henderson, van Slyke und Mitarbeitern unrichtig. Die Berechnungsweise wird aber seinen Wert

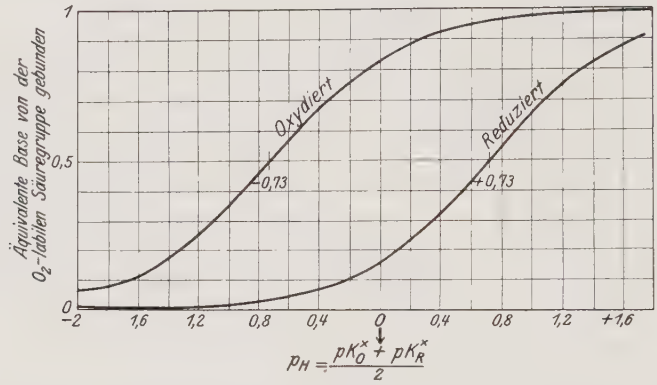

Abb. 15. Nach van Slyke, Hastings, Neil, Heidelberger und Harringtons Diagramm zur Berechnung der pK_O^* und pK_R^* des Hämoglobins, d. h. der Säurezahlen der sauerstofflabilen Säuregruppe des Hämoglobins.

behalten, wenn man gehörige Korrektionen für das komplex gebundene CO_2 einführen kann, und deshalb sind die Arbeiten hier so ausführlich besprochen worden.

V. Die Donnan-Versuche.

Meine ersten Donnan-Versuche mit Hämoglobinlösungen wurden zu einem ganz anderen Zweck als die späteren unternommen. Ich wollte ursprünglich (1923) den isoelektrischen Punkt mittels des Membranpotentials finden, sowie die Variationen der elektrischen Ladung der Hämoglobinmolekel mit Wasserstoff- und Salzionen-Konzentration untersuchen. Wenn diese Grössen festgelegt waren, beabsichtigte ich sie für Hämolysestudien auszuwerten. Ich war damals in der Wassermann-Abteilung des Instituts angestellt und studierte verschiedene chemische und physikalische Einflüsse auf die Hämolyse von Erythrocyten, den Indikator der wichtigen diagnostischen Wassermann-Reaktion.

Donnans Gesetz kann so ausgedrückt werden:

Trennt eine für Salze permeable, für Proteine aber unpermeable Membran

eine reine Salzlösung von einer Lösung von Proteinen und Salzen, dann werden die Salzionen sich so zwischen Aussen- und Innenflüssigkeiten verteilen, dass Elektroneutralität in beiden bestehen bleibt; ist das Protein isoelektrisch, so werden die Ionen sich gleichmässig verteilen; ist das Protein positiv oder negativ elektrisch geladen, so wird eine ungleichmässige Verteilung der Wasserstoffionen sowie der Anionen und Kationen der Salze hervorgerufen; diese wird durch ein elektrisches Membranpotential π kompensiert, das nach Nernsts Formel berechnet werden kann:

$$\pi = \frac{RT}{F} \ln \sqrt[n]{\frac{a\,[\text{Kation}]_{\text{Innen}}}{a\,[\text{Kation}]_{\text{Aussen}}}} = \frac{RT}{F} \ln \sqrt[n]{\frac{a\,[\text{Anion}]_{\text{Aussen}}}{a\,[\text{Anion}]_{\text{Innen}}}}$$

woraus $$\log \sqrt[n]{\frac{a\,[\text{Kation}]_{\text{Innen}}}{a\,[\text{Kation}]_{\text{Aussen}}}} = \log \sqrt[n]{\frac{a\,[\text{Anion}]_{\text{Aussen}}}{a\,[\text{Anion}]_{\text{Innen}}}} = \frac{\pi}{0{,}0577}$$

bei 18° C; n = die Valenz; π wird in Volt gemessen.

Das Membranpotential gibt also die elektrische Ladung des Proteins an; es ist aber ersichtlich, dass man auch die Frage umkehren kann:

Sind π und die Aktivität einer Ionenart in der Aussenflüssigkeit bekannt, dann kann die Aktivität derselben Ionenart in der Innenflüssigkeit berechnet werden; ein Donnan-Dialyseapparat kann somit als eine Universal-Ionenelektrode für Ionenaktivitäten in Proteinlösungen betrachtet werden.

In den ersten Donnan-Versuchen brauchte ich verdünnte Phosphatlösung als Puffer. Hier werden nur einige dieser Vorversuche referiert.

In eine 1-Liter-Flasche wurde 1 g Natriumoxalat gegeben; die Flasche wurde mit hydrophober Baumwolle geschlossen und 1 Stunde bei 150° C trocken sterilisiert; in die Flasche wurde steril ein Liter Pferdeblut genommen; die Flasche wurde geschüttelt und $2^1/_2$ Stunden hingestellt; die Erythrocyten senken sich schöner im Oxalatblut als in defibriniertem Blut. Mit steriler 100 cc-Pipette wurden die Erythrocyten aufgesaugt, in einer sterilen isotonischen Lösung von 3,7% Zucker und 0,185% $NaHCO_3$ zweimal gewaschen und in eine sterile 3-Liter-Flasche mit Heber- und Luftrohr gegossen. Nach Zusatz von gleichem Volumen steriles destilliertes Wassers + 2 cm³ steriler 10%iger Saponinlösung wurde geschüttelt, und die hämolysierte Erythrocytenmasse wurde in vacuo bei 40° C gekocht, wobei O_2 und CO_2 ausgetrieben wurden. Das Vakuum wurde mit N_2 versetzt, und mittels N_2-Überdruckes wurde die Flüssigkeit auf dem Boden von sterilen Zentrifugegläsern unter 1 cm sterilem ausgekochtem Paraffinöl ohne Luftzutritt getrieben. Es wurde scharf zentrifugiert und der Detritus entfernt. Die Lösung (ungefähr 600 cm³) wurde in zwei grosse sterile Kollodiumhülsen pipettiert und 24 Stunden gegen fliessendes Wasser dialysiert; sie wurde dann in eine sterile 2-Liter-Flasche überführt; es wurden 60 cm³ $\frac{m}{15}$ Phosphatmischung (paH 7,35) zugefügt, 20 Minuten in vacuo bei 40° C gekocht, N_2 zugeleitet und geschüttelt.

Die in den Vorversuchen benutzten Dialyseapparate waren nach ganz demselben Prinzip wie die in den Hauptversuchen verwendeten gebaut, bloss dreimal grösser; hinsichtlich der genauen Form sei deshalb an die Abbildung und Beschreibung in III. vorläufiger Mitteilung verwiesen. Das zylindrische Kollodiumrohr fasste ungefähr 90 cc und der Aussenraum ein gleiches Volumen; sowohl zum Innen- wie zum Aussenraum führte ein Luftrohr mit Klemme und ein Heberrohr mit Glashahn. Die Apparate wurden mit 2‰ Formalin sterilisiert und während 24 Stunden mit zahlreichen Portionen sterilem destillierten Wassers gespült. Die Apparate wurden luftdicht mit Vaselin geschlossen und mit N_2 durchgeblasen; dann wurden die Hülsen mit Hämoglobinlösung und die Aussenräume mit $\frac{m}{150}$-Phosphatlösung (paH 7,35) gefüllt. Nach 12 Stunden (18° C) wurden die Donnan-Potentiale zwischen den Glashähnen, paH_{Aussen} (mittels Chinhydron-) und paH_{Innen} (mittels einer leicht modifizierten Hasselbalch-Elektrode mit drei platinierten Goldelektroden) gemessen.

Als Messinstrument für die Membranpotentiale benutzte ich einen Quadrantelektrometer mit 120 Volt Spannung auf der Nadel und mit den Schachtelpaaren an einem Quecksilber-Kommutator nach Kohlrausch geschaltet. Die Leitungen und das Instrument waren sorgfältig isoliert; der Ausschlag wurde auf eine Skala von transparentem Millimeterpapier reflektiert, und seine Grösse wurde mittels Messungen des Potentials zwischen zwei Chinhydronelektroden in Phosphatmischungen von paH 5,85 und 6,85 justiert.

Es dauert bis zu einer halben Stunde, bevor sich das Donnan-Potential „definiert"; in dieser halben Stunde schwanken die Potentiale hin und her,

Tabelle 5.

Hülse	Nach-Stunden	Gefunden			Berechnet	
		Donnan-Potential — m Volt	paH_{Innen}	paH_{Aussen}	Donnan-Potential — m Volt	paH_{Innen}
	2	14,0				
	4	14,0				
1	8	15,0				
	12	14,5	7,20	7,44	14,0	7,19
	18	14,5	7,21	7,45		
	2	14,5				
	4	14,0				
2	8	14,5				
	12	14,0	7,23	7,46	13,0	7,22
	18	14,0	7,22	7,44		
	2	15,0				
	4	14,5				
3	8	15,0				
	12	15,0	7,22	7,57	14,0	7,22
	18	15,0	7,22	7,55		

wahrscheinlich weil die Diffusionspotentiale dominieren; Galvanometer mit Potentiometer kann man nicht benutzen, da der Kompensationsstrom das System „polarisiert"; nach der halben Stunde hat das Potential beinahe seinen endlichen Wert erreicht, und nach zwei Stunden bleibt es konstant.

Die Resultate sind aus vorstehender Tabelle 5 ersichtlich.

Die Übereinstimmung zwischen gefundenen und berechneten Werten ist gut. Das Potential bleibt konstant von der zweiten bis zur achtzehnten Stunde. Die Messzeit 12 Stunden habe ich nur aus praktischen Gründen gewählt.

Der Versuch wurde mit einem neuen Hämoglobinpräparat wiederholt und dieselbe gute Übereinstimmung erreicht (Tab. 6).

Tabelle 6.

Hülse	Gefunden			Berechnet	
	paH_{Innen}	paH_{Aussen}	Donnan-Potential — m Volt	Donnan-Potential — m Volt	paH_{Innen}
1	7,30	7,60	18,0	17,5	7,29
2	7,30	7,62	18,5	18,5	7,30
3	7,31	7,60	17,0	17,0	7,31

Ich beschloss dann, eine Titrierung in den Dialyseapparaten zu unternehmen, um durch die Variationen des Donnan-Potentials mit paH den isoelektrischen Punkt des Hämoglobins zu finden. Zehn Dialyseapparate in hohen Zylindergläsern wurden hergestellt, und aus 2 Liter Pferdeblut wurden 1500 cm³ Hämoglobinlösung nach obengenanten Vorschriften bis zum Phosphatzusatz präpariert. In 5 sterile 100-g-Flaschen wurden 30 cm³ sterile $\frac{m}{15}$ Phosphatmischung (paH 6,86) + den in Tab. 3 genannten Mengen konzentrierter Salzsäure gegossen. Die Hämoglobinlösung wurde mit 300 cm³ auf fünf 2-Liter-Flaschen verteilt; die Phosphat-Salzsäure-Mischungen wurden in feinem Strahl unter energischem Schütteln in die Hämoglobinflaschen gespritzt; diese wurden mit sterilen Gummistöpseln mit Luft- und Heberrohr ausgestattet, in vacuo gekocht und mit N_2 gefüllt. Mittels N_2-Überdrucks wurden zwei sterile N_2-gefüllte Dialyseapparate aus jeder Flasche gefüllt, während die Aussenräume mit N_2-durchgeblasener $\frac{m}{150}$ Phosphatmischung (paH 6,86) gefüllt wurden. Nach 8—10 Stunden wurden das Donnan-Potential, paH_{Aussen} (mittels Chinhydron) und paH_{Innen} (mittels Wasserstoffelektrode) gemessen (Tab. 7).

Diese Resultate waren überraschend; nach den Angaben von Michaelis und Mitarbeitern hatte ich den isoelektrischen Punkt bei paH 6,6 à 6,8

Tabelle 7.

Hülse	cm^3 konz. HCl pr. 300 cm^3 Lösung	Gefunden			Berechnet	
		paH_{Innen}	paH_{Aussen}	Donnan-Potential — m Volt	Donnan-Potential — m Volt	paH_{Innen}
1	0	6,87	7,05	12,0	10,5	6,84
2	0	6,83	7,03	11,0	11,5	6,84
3	0,4	6,54	6,70	7,5	9,5	6,57
4	0,4	geborsten				
5	0,8	6,23	6,30	5,0	4,0	6,21
6	0,8	6,17	6,25	4,5	4,5	6,18
7	1,2	5,91	5,94	2,0	2,0	5,91
8	1,2	5,85	5,86	2,0	0,5	5,83
9	1,6	geborsten				
10	1,6	5,58	5,59	0	0,5	5,59

Tabelle 8.

Hülse	cm^3 konz. HCl pr. 300 cm^3 Lösung	Gefunden			Berechnet	
		paH_{Innen}	paH_{Aussen}	Donnan-Potential — m Volt	Donnan-Potential — m Volt	paH_{Innen}
1	0	6,86	7,0	10,0	8,0	6,83
2	0	6,82	6,96	8,5	8,0	6,82
3	0,4	geborsten				
4	0,4	infiziert				
5	0,8	6,18	6,24	4,0	3,5	6,17
6	0,8	6,23	6,34	4,0	6,5	6,27
7	1,2	5,83	5,85	1,5	1,5	5,83
8	1,2	5,85	5,88	1,5	2,0	5,86
9	1,6	Ausfällungen				
10	1,6	undicht				

Tabelle 9.

Hülse	cm^3 konz. Hbl pr. 300 cm^3 Lösung	Gefunden			Berechnet	
		paH_{Innen}	paH_{Aussen}	Donnan-Potential — m Volt	Donnan-Potential — m Volt	paH_{Innen}
1	0	6,79	6,95	9,5	9,5	6,79
2	0	undicht				
3	0,4	6,59	6,72	6,5	7,5	6,61
4	0,4	infiziert				
5	0,8	6,23	6,26	3,0	2,0	6,21
6	0,8	6,25	6,32	3,0	4,0	6,27
7	1,2	5,83	5,87	1,0	2,5	5,85
8	1,2	5,78	5,81	1,0	2,0	5,79
9	1,6	geborsten				
10	1,6	koaguliert				

erwartet: das Hämoglobin schien also durch den Phosphatzusatz elektronegativiert zu sein; gleichzeitig boten die Aussenflüssigkeiten eine Besonderheit dar: spurenweise Zufügungen von $\frac{n}{100}$ HCl oder $\frac{n}{100}$ NaOH änderten paH sehr stark. Die Elektronegativierung des Hämoglobins schien sich somit unter Abnahme von Phosphationen aus der Lösung

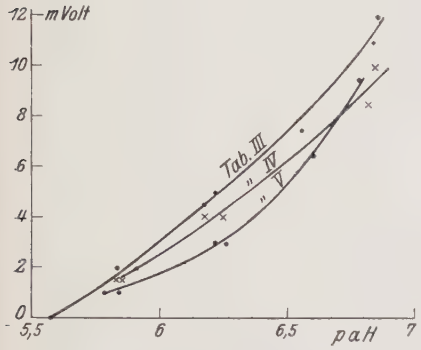

Abb. 16. Donnan-Potentialkurven von Phosphat-Hämoglobinlösungen.

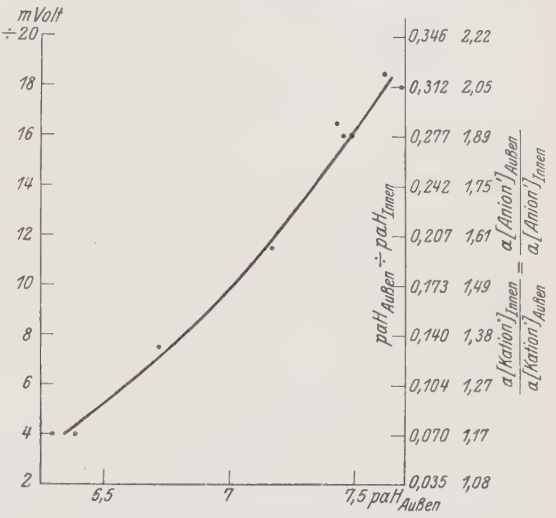

Abb. 17. Donnan-Potentialkurve. 1. Versuchsreihe.

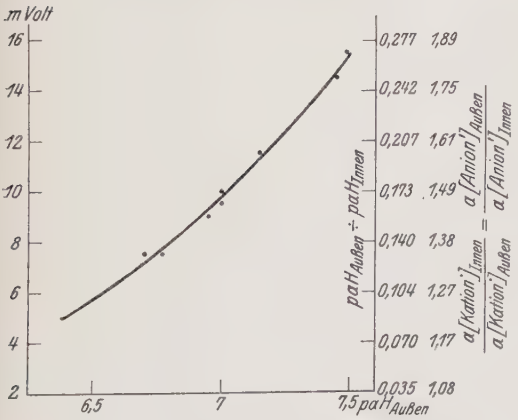

Abb. 18. Donnan-Potentialkurve. 2. Versuchsreihe.

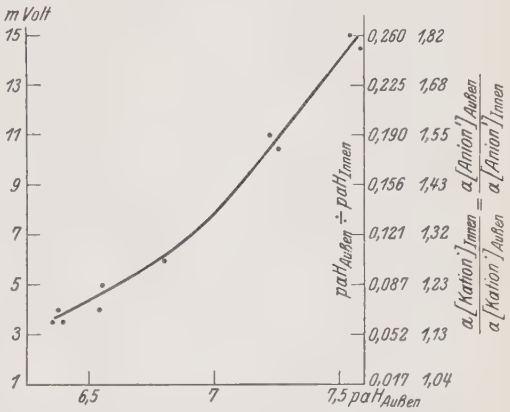

Abb. 19. Donnan-Potentialkurve. 3. Versuchsreihe.

abzuspielen. In diesen Versuchen lag der isoelektrische Punkt bei ungefähr paH 5,5; zwei andere Versuche zeigten dasselbe (Tab. 8 und 9, Abb. 16).

Mein ursprünglicher Zweck der Untersuchungen (die Hämolysestudien) musste jetzt in den Hintergrund treten. Das nachgewiesene Phänomen: die Elektronegativierung vom Hämoglobin unter Entfernen von Ionen aus der Lösung war von so grosser, physiologischer Tragweite, dass ich mich zu einem ausschliesslichen Studium des Verhaltens der physiologisch wichtigsten Ionen Chlor und Bicarbonat entschloss.

Es lohnt sich kaum, die Versuchsergebnisse und meine theoretischen Überlegungen in chronologischer Ordnung wiederzugeben. Ursprünglich meinte ich nämlich, dass es die Bicarbonationen waren, die sich komplex an

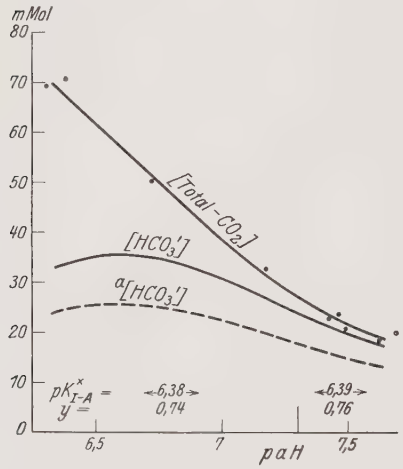

Abb. 20. Verteilung von gelöstem CO_2, Bicarbonationen und Bicarbonationenaktivitäten in der Aussenflüssigkeit. 1. Donnan-Versuchsreihe.

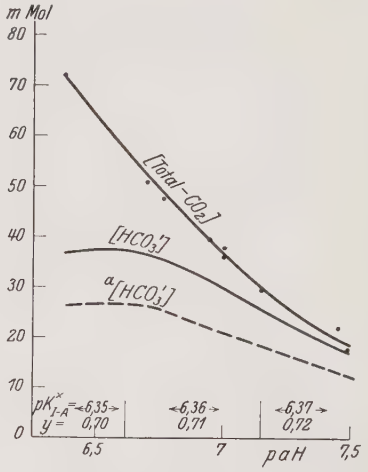

Abb. 21. Verteilung von gelöstem CO_2, Bicarbonationen und Bicarbonationenaktivitäten in der Aussenflüssigkeit. 2. Donnan-Versuchsreihe.

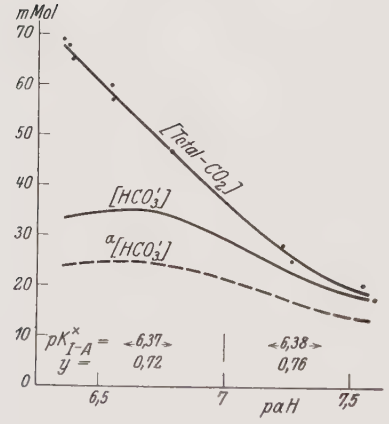

Abb. 22. Verteilung von gelöstem CO_2, Bicarbonationen und Bicarbonationenaktivitäten in der Aussenflüssigkeit. 3. Donnan-Versuchsreihe.

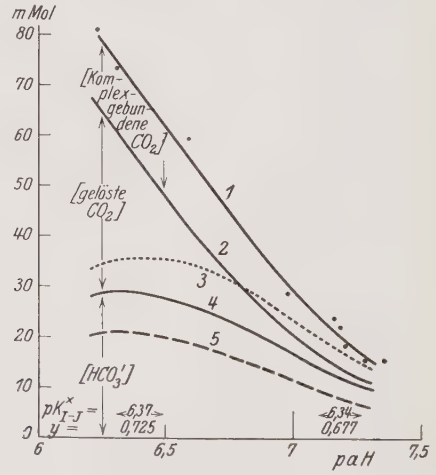

Abb. 23. Verteilung von gelöstem CO_2, Bicarbonationen und Bicarbonationenaktivitäten in der Innenflüssigkeit. 1. Donnan-Versuchsreihe.

das Hämoglobin banden; erst die „Explosions"-Analysen haben sichergestellt, dass es das CO_2 und nicht die Bicarbonationen sind.

Unter diesem Gesichtswinkel werden deshalb die Versuchsergebnisse und die Berechnungen beschrieben.

In bezug auf die Technik muss auf die III. vorläufige Mitteilung verwiesen werden. Die Berechnungen der Versuchsergebnisse sind indessen hier

in ein wenig anderer Weise durchgeführt. Die Werte von pK_I^* des CO_2 sind aus

$$pK_I^* = pK_I - 0{,}50\sqrt{\mu} = 6{,}51 - 0{,}50\sqrt{\mu}$$

berechnet, und die Werte von den Aktivitätskoeffizienten (y) der Bicarbonationen entsprechend aus

$$y = \text{antilog.}(-0{,}50\sqrt{\mu})$$

(siehe die Messungen von Hastings und Sendroy). Überall ist mit paH und nicht mit p_H gerechnet. Die Werte der Aktivitätskoeffizienten (f_{Cl}) der Chlorionen sind aus

$$f_{Cl} = \text{antilog.}(-0{,}35\sqrt{\mu})$$

berechnet (siehe Lewis und Randall). Die berechneten Werte sind am Fusse der Kurventafel angeführt.

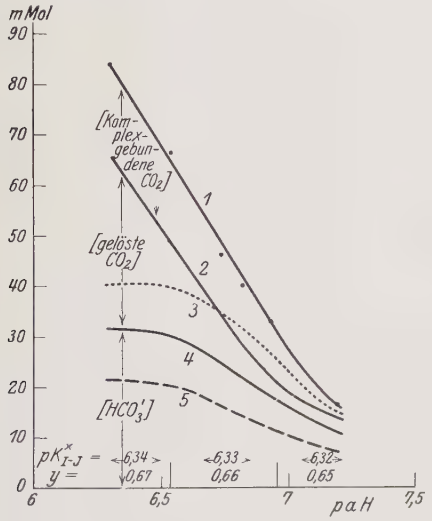

Abb. 24. Verteilung von gelöstem CO_2, Bicarbonationen und Bicarbonationenaktivitäten in der Innenflüssigkeit. 2. Donnan-Versuchsreihe.

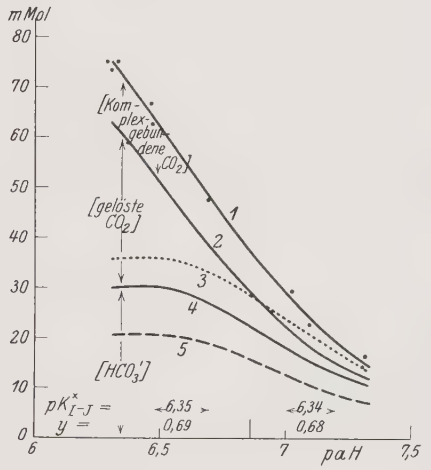

Abb. 25. Verteilung von gelöstem CO_2, Bicarbonationen und Bicarbonationenaktivitäten in der Innenflüssigkeit. 3. Donnan-Versuchsreihe.

In den Tabellen 10, 11 und 12 sind alle Versuchsdaten aus drei Versuchsreihen wiedergegeben.

Die Abb. 17, 18 und 19 zeigen die Membran-Potentialkurven.

Die Abb. 20, 21 und 22 zeigen die Verteilung von gelöstem CO_2, Bicarbonationen und Bicarbonationenaktivitäten in den Aussenflüssigkeiten; die Konzentrationen von CO_2 und HCO'_3 sind aus

$$[CO_2] = \frac{[\text{Total-}CO_2]}{\text{antilog.}(\text{paH} - pK_I^*) + 1}$$

und

$$[HCO'_3] = \frac{[\text{Total-}CO_2]}{\text{antilog.}(pK_I^* - \text{paH}) + 1}$$

berechnet; die a $[HCO'_3]$-Werte sind aus $[HCO'_3]$ durch Multiplikation mit y gefunden.

Tabelle 10.

Vor dem Versuch: Innenflüssigkeit 30,5% Trockenstoff, 30 Millimol NaCl und 84 Millimol Na (aus Na_2CO_3) pro 1000 g Wasser. Aussenflüssigkeit 30 Millimol NaCl und 25 Millimol $NaHCO_3$ pro 1000 g Wasser.

Membran Nr.	a Gesättigt bei CO_2-Druck mm Hg	b Membranpotential Millivolt	c paH_{Aussen} (Kolorim.)	d paH_{Innen} (H_2-Elektr.)	e paH_{Innen} (aus b und c ber.)	f Total mM $[CO_2]_{Aussen}$	g Total mM $[CO_2]_{Innen}$	h mM $[Cl']_{Aussen}$	i mM $[Cl']_{Innen}$
1	26	geborsten							
2	—	18,0	7,69	7,33	7,38	20,0	15,5	33,6	23,6
3	—	18,5	7,62	7,24	7,30	18,3	15,5	36,4	21,0
4	34	16,0	7,46	7,19	7,18	23,6	22,2	35,0	22,5
5	—	16,0	7,49	7,20	7,21	20,6	18,2	34,0	23,6
6	—	16,5	7,43	7,18	7,15	23,0	23,7	33,1	24,7
7	86	undicht							
8	—	infiziert							
9	—	11,5	7,17	7,0	6,97	32,5	28,6	35,0	23,9
10	312	7,5	6,72	nicht gemessen	6,59	50,2	59,1	30,4	28,5
11	—	impermeabel							
12	—	undicht							
13	637	4,0	6,30	„	6,23	69,2	81,6	31,5	27,5
14	—	Ausfällungen							
15	—	4,0	6,38	„	6,31	70,5	73,5	31,0	29,0

Tabelle 11.

Vor dem Versuch: Innenflüssigkeit 29,5% Trockenstoff, 50 Millimol NaCl und 89 Millimol Na (aus Na_2CO_3) pro 1000 g Wasser. Aussenflüssigkeit 50 Millimol NaCl und 25 Millimol $NaHCO_3$ pro 1000 g Wasser.

Membran Nr.	a Gesättigt bei CO_2-Druck mm Hg	b Membranpotential Millivolt	c paH_{Aussen} (Kolorim.)	d paH_{Innen} (H_2-Elektr.)	e paH_{Innen} (aus b und c ber.)	f Total mM $[CO_2]_{Aussen}$	g Total mM $[CO_2]_{Innen}$	h mM $[Cl']_{Aussen}$	i mM $[Cl']_{Innen}$
1	35	14,5	7,45	7,19	7,20	22	16,5	56,5	42,1
2	—	15,5	7,49	7,23	7,22	17,5	15,5	54,5	40,0
3	—	undicht							
4	92	infiziert (Proteus)							
5	—	Ausfällungen							
6	—	11,5	7,15	6,91	6,96	29,5	32,5	55,0	45,3
7	163	9,5	7,0	6,88	6,84	35,5	38,0	54,6	45,0
8	—	9,0	6,95	6,85	6,79	42,0	39,5	53,1	46,2
9	—	10,0	7,0	6,80	6,83	37,5	40,5	51,4	44,0
10	305	undicht							
11	—	7,5	6,77	nicht gemessen	6,73	47,5	46,5	53,0	45,0
12	—	7,5	6,70	„	6,53	50,5	66,5	51,8	47,5
13	591	geborsten							
14	—	5,0	6,38	„	6,29	72,0	84,0	51,4	47,6
15	—	impermeabel							

In den Abb. 23, 24 und 25 geben die Kurven 1 gefundenes [Total-CO_2] in den Innenflüssigkeiten wieder, während die Kurven 3 die $[HCO'_3]_{Innen}$-Mengen zeigen, die aus den Kurven 1 zu kalkulieren sind, falls $[Total\text{-}CO_2]_{Innen}$ nur aus [gelöst. CO_2] + $[HCO'_3]$ bestehe. Die Kurven 5 repräsentieren die $a[HCO'_3]_{Innen}$-Mengen, die aus $a[HCO'_3]_{Aussen}$ und den Membranpotentialen zu berechnen sind; die Kurven 4 zeigen die aus den Kurven 5 berechneten $[HCO'_3]_{Innen}$-Mengen, und die Kurven 2 stellen die aus den Kurven 4 zu berechnenden Mengen $[Total\text{-}CO_2]_{Innen}$ dar. Die Ordinatendifferenzen zwischen den Kurven 1 und 2 geben also die Mengen von komplex gebundenem CO_2 bei den verschiedenen Wasserstoffionenaktivitäten an.

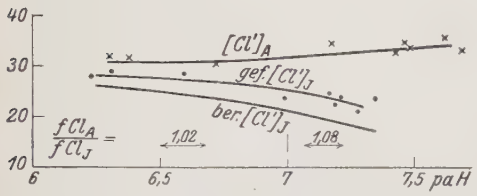

Abb. 26. Die Verteilung der Chlorionen zwischen Aussen- und Innenflüssigkeiten. 1. Donnan-Versuchsreihe.

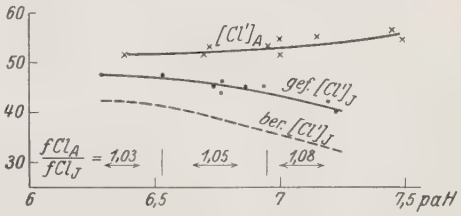

Abb. 27. Die Verteilung der Chlorionen zwischen Aussen- und Innenflüssigkeiten. 2. Donnan-Versuchsreihe.

Tabelle 12.

Vor dem Versuch: Innenflüssigkeit 28% Trockenstoff, 40 Millimol NaCl und 92,7 Millimol Na (aus Na_2CO_3) pro 1000 g Wasser. Aussenflüssigkeit 40 Millimol NaCl und 25 Millimol $NaHCO_3$ pro 1000 g Wasser.

Membran Nr.	a Gesättigt bei CO_2-Druck mm Hg	b Membranpotential Millivolt	c paH_{Aussen} (Kolorim.)	d paH_{Innen} (H_2-Elektr.)	e paH_{Innen} (aus b und c ber.)	f Total mM $[CO_2]_{Aussen}$	g Total mM $[CO_2]_{Innen}$	h mM $[Cl']_{Aussen}$	i mM $[Cl']_{Innen}$
16	25	15,0	7,55	7,32	7,29	21,1	14,1	43,6	31,4
17	—	14,5	7,60	7,29	7,33	17,6	16,4	45,7	34,0
18	—	undicht							
19	64	geborsten							
20	—	10,5	7,26	7,13	7,08	24,8	22,7	44,6	33,2
21	—	11,0	7,23	7,00	7,04	27,6	29,2	42,4	35,5
22	209	Ausfällungen							
23	—	6,0	6,79	nicht gemessen	6,69	47,1	47,5	42,2	36,6
24	—	infiziert (Proteus)							
25	438	undicht							
26	—	5,0	6,55	„	6,46	56,8	66,4	43,3	39,0
27	—	4,0	6,54	„	6,47	60,0	62,6	40,5	35,8
28	612	3,5	6,39	„	6,33	65,2	75,1	41,5	37,4
29	—	4,0	6,37	„	6,30	67,6	73,0	40,8	40,0
30	—	3,5	6,35	„	6,29	69,1	74,8	40,2	38,8

Die Abb. 26, 27 und 28 zeigen die mittels Analysen gefundenen Werte von $[Cl']_{Aussen}$ und $[Cl']_{Innen}$, sowie sie aus $[Cl']_{Aussen}$ und den Membranpotentialen berechneten Werte von $[Cl']_{Innen}$, die alle unter den mittels Analysen gefundenen Werten liegen.

Schliesslich geben die Abb. 29, 30 und 31 die folgenden Berechnungen wieder: stellen wir uns nach van Slyke und Mitarbeitern, Stadie und Hawes und meinen eigenen ursprünglichen Anschauungen vor, dass die Aktivität der Bicarbonationen in Hämoglobin-CO_2-Lösungen abnorm stark verkleinert seien; dividieren wir die Ordinatendifferenzen zwischen den Kurven 3 und 4 der Abb. 23, 24 und 25 durch die Ordinatenhöhen der Kurven 3, so erhalten wir (nach Multiplikation mit 100) die „Aktivitätshemmungsprozente" der Bicarbonationen in den Innenflüssigkeiten, die in den Abb. 29, 30 und 31 wiedergegeben sind. Ferner sind hier die „Aktivitätshemmungs"prozente der Chlorionen in der Innenflüssigkeit abgebildet, die durch Division der Differenzen durch die gefundenen $[Cl']_{Innen}$-Werte der Abb. 26, 27 und 28 und nachherige Multiplikation mit 100 berechnet sind.

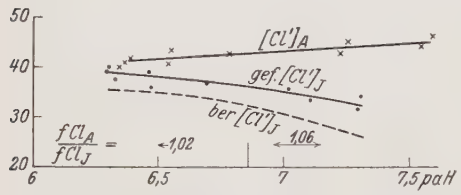

Abb. 28. Die Verteilung der Chlorionen zwischen Aussen- und Innenflüssigkeiten. 3. Donnan-Versuchsreihe.

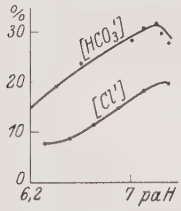

Abb. 29. „Komplexbindungsgrad" der Bicarbonat- und Chlorionen. 1. Donnan-Versuchsreihe.

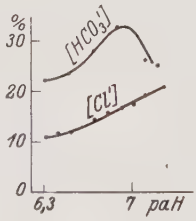

Abb. 30. „Komplexbindungsgrad" der Bicarbonat- und Chlorionen. 2. Donnan-Versuchsreihe.

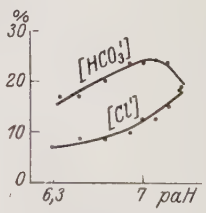

Abb. 31. „Komplexbindungsgrad" der Bicarbonat- und Chlorionen. 3. Donnan-Versuchsreihe.

Es geht aus den Abb. 29, 30 und 31 deutlich hervor, dass die supponierten „Aktivitätshemmungen" der zwei monovalenten Anionen gar nicht dieselben Variationen mit der Wasserstoffionaktivität zeigen. Das nachgewiesene „Verschwinden" von Bicarbonat- und Chlorionenaktivitäten kann also nicht von seiten eines allgemeinen aktivitätsverkleinernden Einflusses der Hämoglobinmolekel herrühren, sondern es muss durch spezifische Bindungen zwischen Hämoglobin auf der einen Seite und Chlorionen und Bicarbonationen oder Kohlendioxyd auf der anderen Seite erklärt werden.

Ein direkter Vergleich zwischen meinen (4—5 Jahre alten) und Stadie und Hawes Versuchen (1928) ist wegen der Verschiedenheit der Versuchs-

anordnungen nicht möglich. Aus den Betrachtungen in Kap 2 erhellt aber, dass unsere Resultate zu denselben Schlüssen führen müssen; die „Entfernung" von Bicarbonat- und Chlorionen aus den Hämoglobinlösungen können nur durch die eine oder andere für jede Ionenart spezielle Komplexbindung erklärt werden. Keine der Methoden kann indessen die Komplexbindungsart beleuchten.

Die im nächsten Kapitel referierten Geschwindigkeitsversuche und die rein physiologischen Betrachtungen in der Einleitung machen es wahrscheinlich, dass die „Entfernung" von Bicarbonationenaktivitäten aus Hämoglobinlösungen sich durch eine Komplexbindung von CO_2 an die Hämoglobinmolekel abspielt.

VI. Die Geschwindigkeitsversuche.

Die Donnan-Versuche hatten mir gezeigt, dass ein Teil des gebundenen CO_2 in Lösungen von CO_2 und Hämoglobin komplex an das Hämoglobin gebunden ist; die in der Einleitung widergegebenen Berechnungen der Geschwindigkeit des CO_2-Wechsels in den Blutcapillaren hatten gezeigt, dass das Hämoglobin die Fähigkeit besitzen muss, CO_2 schnell aus seiner gebundenen Form auswechseln zu können. Der experimentelle Nachweis dieser Fähigkeit bot gewisse Schwierigkeiten; es gelang schliesslich eine Technik auszuarbeiten, mit welcher sich zeigen liess, dass Hämoglobinlösungen — nicht aber einfache CO_2-Bicarbonat-Lösungen wie Sera — ein Teil ihres gegenwärtig gebundenen CO_2 schnell abgeben, wenn sie plötzlich einem Torricelli-Vakuum ausgesetzt werden. Hinsichtlich des Apparates und der Technik muss auf die vorläufige Mitteilung verwiesen werden.

Die Tabellen 13—15 und die Abb. 32, 33 und 34 zeigen die Resultate von drei Versuchen mit drei verschiedenen Pferde-Seris; es geht hieraus hervor, dass nach 10 Minuten die Reaktion zu Ende gekommen ist (aus den Kurven zu extrapolieren), d. h. zum Gleichgewicht zwischen dem Kohlensäure-Bicarbonat-CO_2-Inhalt der Flüssigkeit und dem CO_2-Druck in der Explosionskammer; die Analysen zeigen, dass dieses Gleichgewicht entspricht:

I. Versuch: 22 Vol.-% CO_2 aus Serum; $\frac{22 \cdot 2}{100} = 0{,}44$ Vol.-% = 3,3 mm Hg-Druck im Gas

II. „ 19 „ „ „ „ $\frac{19 \cdot 2}{100} = 0{,}38$ „ „ = 2,9 „ „ „ „

III. „ 26 „ „ „ „ $\frac{26 \cdot 2}{100} = 0{,}52$ „ „ = 4,0 „ „ „ „

Auf den Abbildungen sind als Ordinaten eingetragen: links Vol.-% CO_2 und rechts $\log \frac{a}{a-x}$, wo a = die nach 10 Minuten ausgepumpte Menge CO_2 und x = die zur gegebenen Zeit ausgepumpte Menge CO_2; beide in Vol.-% ausgedrückt [1]; die Abszissen geben die Zeit in Sekunden an.

[1] In der vorläufigen Mitteilung sind leider Schreibfehler unterlaufen.

Tabelle 13.
40 ccm Pferdeserum in 6-Literflasche bei 59 mm CO_2 bei 18° C gesättigt.

Sekunden	Vol.-% CO_2 ausgepumpt		Sekunden	Vol.-% CO_2 ausgepumpt	
	erste Reihe	zweite Reihe		erste Reihe	zweite Reihe
5	1,5	1,5	80	12,5	11,0
10	2,0	3,5	120	13,5	16,0
20	5,0	5,0	600	20,5	23,5
40	7,5	8,5			

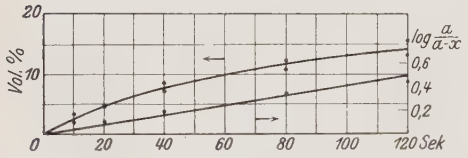

Abb. 32. „Explosionsanalyse" eines Pferdeserums (vgl. Tabelle 13).

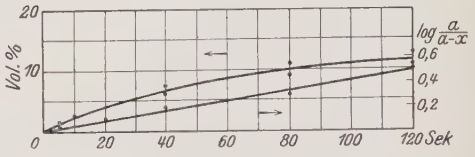

Abb. 33. „Explosionsanalyse" eines Pferdeserums (vgl. Tabelle 14).

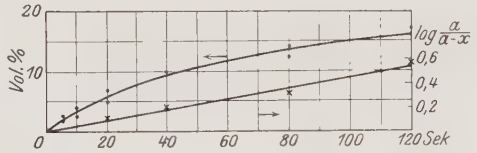

Abb. 34. „Explosionsanalyse" eines Pferdeserums (vgl. Tabelle 15).

Tabelle 14.
40 ccm Pferdeserum in 6-Literflasche bei 48 mm CO_2 bei 18° C gesättigt.

Sekunden	Vol.-% CO_2 ausgepumpt		Sekunden	Vol.-% CO_2 ausgepumpt	
	erste Reihe	zweite Reihe		erste Reihe	zweite Reihe
5	0,5	1,5	80	11,0	9,0
10	2,5	2,5	120	10,0	13,0
20	5,0	3,0	600	21,0	17,0
40	6,0	7,5			

Tabelle 15.
40 ccm Pferdeserum in 6-Literflasche bei 81 mm CO_2 bei 18° C gesättigt.

Sekunden	Vol.-% CO_2 ausgepumpt		Sekunden	Vol.-% CO_2 ausgepumpt	
	erste Reihe	zweite Reihe		erste Reihe	zweite Reihe
5	1,5	2,5	80	14,0	12,5
10	2,5	4,0	120	14,0	17,5
20	7,0	5,0	600	28,0	24,0
40	9,0	10,0			

Es ist ersichtlich, dass die Werte sich schön der geraden Linien entlang gruppieren; diese Linien entsprechen der Formel eines monomolekularen Prozesses:

$$t = \frac{1}{K} \log \frac{a}{a-x},$$

d. h. die Formel gilt für den kombinierten Prozess (den Bicarbonat-Kohlensäure-CO_2-Umsatz + Austreibung des gelösten CO_2) bei den gegebenen Versuchsbedingungen.

Die Tabellen 16—19 und die Abb. 35—38 zeigen die Resultate von vier ähnlichen Versuchen mit Hämoglobinlösungen.

Tabelle 16.

40 ccm einer 24%igen, reduzierten Pferdehämoglobinlösung in 6-Literflasche bei 67 mm CO_2 bei 18° C gesättigt.

Sekunden	Vol.-% CO_2 ausgepumpt		Sekunden	Vol.-% CO_2 ausgepumpt	
	erste Reihe	zweite Reihe		erste Reihe	zweite Reihe
5	29,0	28,0	80	42,0	42,0
10	29,0	30,0	120	46,0	48,0
20	32,5	34,0	600	56,0	54,0
40	38,0	36,0			

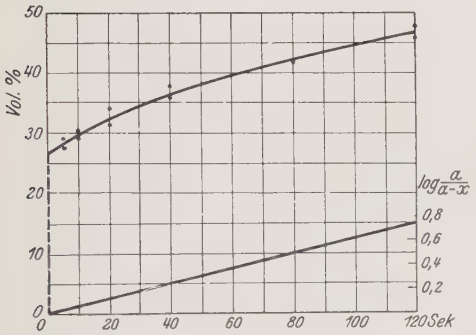

Abb. 35.
„Explosionsanalyse" einer Pferdehämoglobinlösung (vgl. Tabelle 16).

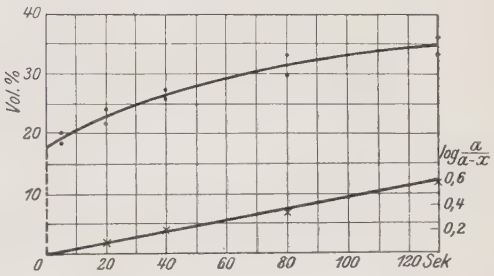

Abb. 36.
„Explosionsanalyse" einer Pferdehämoglobinlösung (vgl. Tabelle 17).

Tabelle 17.

40 ccm einer 17%igen, reduzierten, dialysierten, krystallisierten Pferdehämoglobinlösung in 6-Literflasche bei 71 mm CO_2 bei 18° C gesättigt.

Sekunden	Vol.-% CO_2 ausgepumpt		Sekunden	Vol.-% CO_2 ausgepumpt	
	erste Reihe	zweite Reihe		erste Reihe	zweite Reihe
5	20,5	18,5	80	30,0	28,5
10	20,5	22,5	120	36,5	33,5
20	24,5	22,0	600	38,0	42,0
40	26,0	27,5			

Aus den Tabellen 13—19 und den Abbildungen 32—38 erhellt:

1. Die drei verschiedenen Serumproben geben nur langsam das gebundene CO_2 ab und — wie seit langem bekannt — im ganzen nur verhältnis-

Tabelle 18.

40 ccm einer 21%igen, reduzierten, dialysierten, krystallisierten Pferdehämoglobinlösung in 6-Literflasche bei 47 mm CO_2 bei 18° C gesättigt.

Sekunden	Vol.-% CO_2 ausgepumpt		Sekunden	Vol.-% CO_2 ausgepumpt	
	erste Reihe	zweite Reihe		erste Reihe	zweite Reihe
5	21,0	22,5	80	37,0	34,0
10	22,5	24,5	120	37,0	41,0
20	26,0	24,0	600	43,0	47,0
40	28,5	30,5			

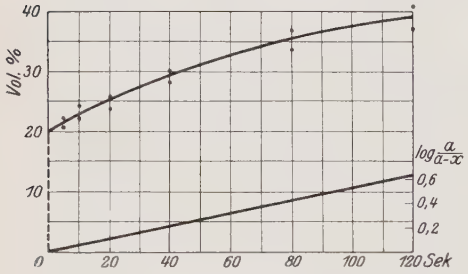

Abb. 37.
„Explosionsanalyse" einer Pferdehämoglobinlösung (vgl. Tabelle 18).

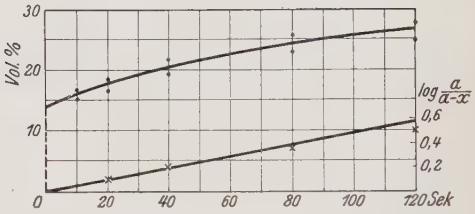

Abb. 38.
„Explosionsanalyse" einer Pferdehämoglobinlösung (vgl. Tabelle 19).

Tabelle 19.

40 ccm einer 14%igen, reduzierten, dialysierten, krystallierten Pferdehämoglobinlösung in 6-Literflasche bei 58 mm CO_2 bei 18° C gesättigt.

Sekunden	Vol.-% CO_2 ausgepumpt		Sekunden	Vol.-% CO_2 ausgepumpt	
	erste Reihe	zweite Reihe		erste Reihe	zweite Reihe
5	15,0	15,0	80	23,0	26,0
10	15,5	17,0	120	28,0	25,0
20	16,5	18,5	600	33,5	30,0
40	22,0	19,5			

mässig wenig; die Ursache des letztgenannten Verhältnisses ist, dass das Serum beim Entfernen des gelösten CO_2 so alkalisch wird, dass das $H_2CO_3 \rightleftarrows HCO'_3$-Gleichgewicht sehr stark nach rechts geschoben wird; die Geschwindigkeitskonstante schwankt nur von 0,0042—0,0044.

2. Die vier Hämoglobinlösungen lösen „momentan" etwa die Hälfte des abzugebenden CO_2 aus, während der Rest ungefähr wie aus den Serumproben einem molekularen Reaktionsverlauf gemäss entweicht; die Geschwindigdigkeitskonstante schwankt hier zwischen 0,0048 und 0,0051.

Wie in der vorläufigen Mitteilung hervorgehoben, sprechen die Hämoglobin-Kurven einem einheitlichen Prozess entgegen, d. h. gegen eine Katalyse der Bicarbonatanhydrierung; man musste in so einem Falle eine Katalyse den ganzen Prozess hindurch erwarten. Die Kurven können meiner Meinung

nach nur in der Weise gedeutet werden, dass das CO_2 in Hämoglobinlösungen in zwei verschiedenen Arten gebunden ist: 1. in einem schnellreagierenden und 2. als Bicarbonat.

Halten wir dieses Resultat mit den Resultaten meiner Donnan-Versuche (und mit den Resultaten von Stadie und Hawes „Dissoziationskonstante"-Messungen) zusammen, dann ergibt sich eine Komplexbindung von CO_2 an die Hämoglobinmolekel als die einzige zwanglose und natürliche Erklärung sowohl von dem „Verschwinden" der Bicarbonationenaktivitäten als auch von dem zweiphasigen Reaktionsverlaufe der Abgabe des gebundenen CO_2.

Soweit reicht die „Explosions-Analyse"-Technik völlig aus.

Ein wenig zweifelhaft ist es aber, ob sie für eine quantitative Auswertung des CO_2-Komplexbindungsvermögens von reduzierten und oxydierten Hämoglobinlösungen, die bei variierten CO_2-Drucken gesättigt sind, genügt. In meiner IV. vorläufigen Mitteilung ist ein derartiger Versuch wiedergegeben; unten wird noch ein Versuch referiert; als dieser abgeschlossen war, zeigte sich der Messhahn so abgenutzt, dass der Apparat zu kassieren war.

Meine Bedenken hinsichtlich der Haltbarkeit der Analysenwerte sind schon in der vorläufigen Mitteilung hervorgehoben. Der hier neu mitgeteilte Versuch zeigt indessen ganz dieselben Eigentümlichkeiten der Verteilung des gebundenen CO_2 zwischen Komplexbindung und Bicarbonatsystem.

Tabelle 20.
18,5%ige Hämoglobinlösung, 18° C.

	CO_2 mm	5 Sek. Anal. Vol.-%	„0-Sek." Anal. Vol.-%	Total-CO_2 Vol.-%	CO_2 mm	5 Sek. Anal. Vol.-%	„0-Sek." Anal. Vol.-%	Total-CO_2 Vol.-%
	18	9,0	7,5	42,5	42	21,5	20,0	52
	—	8,0	6,5		66	27,5	26,0	59
Reduziert	28	15,0	13,5	50	—	25,5	24,0	
	—	12,5	11,0		102	30,5	29,0	70,5
	42	20,0	18,5		—	32,5	31,0	
	21	6,5	5,0	43	49	13,5	12,0	
	—	3,5	2,0		65	20,0	18,5	58
Oxydiert	31	7,5	6,0	44,5	—	23,0	21,5	
	—	8,5	7,0		110	32,5	31,0	66,5
	49	15,5	14,0	50,5	—	30,5	29,0	

Eine genauere Fehlerberechnung erlaubt das infolge Schwierigkeiten der Ausführung etwas begrenzte Versuchsmaterial natürlich nicht; man muss sich mit einer Schätzung begnügen. Die Punkte der Analysenwerte gruppieren sich ja ganz schön die gezogenen Kurven entlang, und die Reproduzierbarkeit des Versuches muss wohl für den Typus des Komplexbindungsverlaufes bürgen.

Die gefundenen CO_2-Komplexbindungskurven sind den O_2-Bindungskurven des Hämoglobins sehr ähnlich; wie CO_2 Sauerstoff aus dem

Tabelle 21.

21%ige Hämoglobinlösung, 18° C.

	CO_2 mm	5 Sek. Anal. Vol.-%	„0-Sek." Anal. Vol.-%	Total-CO_2 Vol.-%	CO_2 mm	5 Sek. Anal. Vol.-%	„0-Sek." Anal. Vol.-%	Total-CO_2 Vol.-%
Reduziert	26	11,5	10,0	48,2	64	28,5	27,0	64,0
	—	9,0	7,5	—	90	31,0	29,5	71,5
	37	16,0	14,5	52,0	—	34,0	32,5	—
	—	18,0	16,5	—	106	34,5	33,0	73,0
	64	28,5	27,0	64,0	—	33,5	32,0	—
Oxydiert	22	3,0	0,5	43,0	58	17,5	16,0	59,0
	—	4,5	3,0	—	83	28,5	27,0	63,0
	41	10,0	8,5	49,0	—	27,0	25,5	—
	—	8,5	7,0	—	109	31,5	30,0	71,5
	58	15,5	14,0	59,0	—	36,5	35,0	—

Hämoglobin verdrängt, verdrängt Sauerstoff CO_2; wie die O_2-Bindungskurven sind die CO_2-Komplexbindungskurven S-förmig und nähern sich von etwa 100 mm Gasdruck ab der Abszisse asymptotisch (vielleicht sind doch die Messungen bei diesen hohen Drucken nicht so genau, dass diese letzte Folgerung aufrecht haltbar wird). Alle die Konsequenzen für den respiratorischen Gaswechsel, die man aus den O_2-Bindungskurven abgeleitet hat, können somit — mutatis mutantis — für den CO_2-Wechsel verwertet werden. Natürlich muss doch ein viel grösseres Versuchsmaterial vorliegen, bevor dieses in Einzelheiten möglich wird. Es sei endlich bemerkt, dass ich vergebens versucht habe, die Hillsche „Exponentialformel" auf meine CO_2-Kurven anzuwenden.

Ein sehr interessantes Problem stellen die Bicarbonatkurven dar (Abb. 40 und 42); sie sind beim Abziehen der „0-Sekunden"-kurvenordinaten von denen der Total-CO_2-Kurven berechnet und zeigen das scheinbar paradoxe Verhalten, dass der Gehalt von Bicarbonat in Hämoglobinlösungen mit steigenden CO_2-Drucken innerhalb gewisser Druckgebiete sinkt, und diese Druckgebiete scheinen eben diejenigen zu sein, die physiologisch wichtig sind.

Es muss jedoch sofort hervorgehoben werden, dass diese absolute Verminderung des Bicarbonatgehaltes auf Versuchsfehlern beruhen kann; es ist aber ganz sicher, dass eine relative Verminderung des Bicarbonatgehaltes vorhanden sein muss, dass also weniger Bicarbonat in der Lösung ist, als man bei einer CO_2-Titrierung einer einfachen (gleich starken) Pufferlösung hat. Denn erstens verschwindet ein grosser Teil des CO_2 vom Bicarbonat-System als komplexgebunden, und zweitens wirkt dieser Teil nicht bloss nicht als Säure puffersättigend, sondern eben entgegengesetzt, indem er das Hämoglobin elektronegativiert (siehe die Donnan-Versuche), d. h. er macht das Hämoglobin zu einer stärkeren Säure.

Endlich sei hier die Aufmerksamkeit auf ein seit langem bekanntes Phänomen gelenkt: Während es nicht möglich ist, Serum von gebundenem CO_2 mittels einfachen Auspumpens zu befreien, gelingt das sehr leicht mit

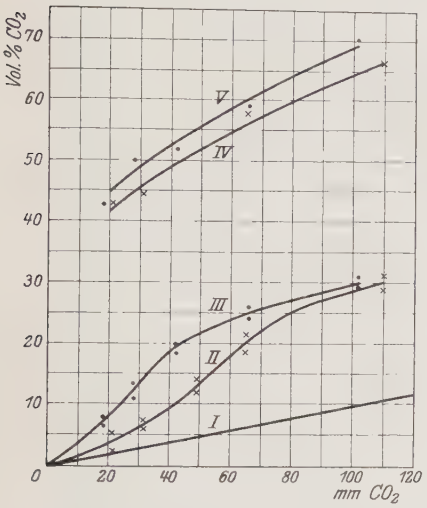

Abb. 39. „Explosionsanalysen" (Kurven III und II) sowie Analysen des Total-CO_2 (Kurven V und IV) einer reduzierten und oxydierten Hämoglobinlösung (vgl. Tabelle 20); die Kurve I repräsentiert das gelöste CO_2.

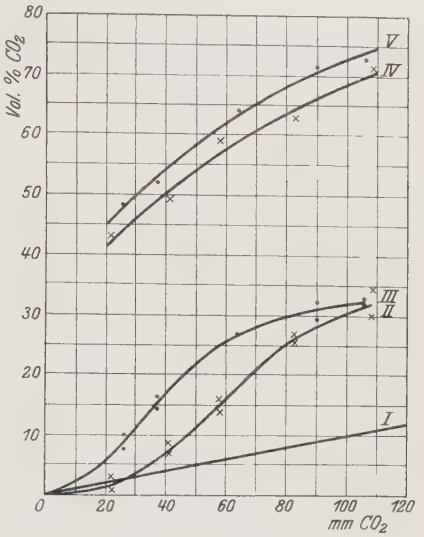

Abb. 41. „Explosionsanalysen" (Kurven III und II) sowie Analysen des Total-CO_2 (Kurven V und IV) einer reduzierten und oxydierten Hämoglobinlösung (vgl. Tabelle 21); die Kurve I repräsentiert das gelöste CO_2.

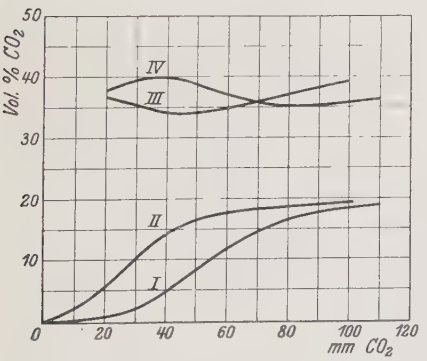

Abb. 40. Komplexgebundenes CO_2 (Kurven II und I) und Bicarbonat (Kurven III und IV) einer reduzierten und oxydierten Hämoglobinlösung (vgl. Tabelle 20).

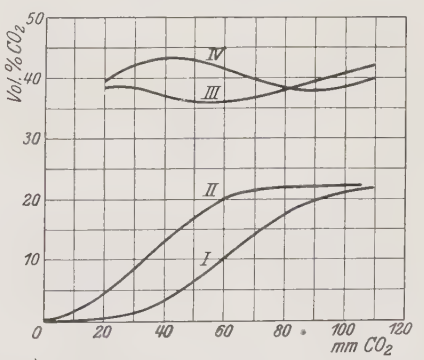

Abb. 42. Komplexgebundenes CO_2 (Kurven II und I) und Bicarbonat (Kurven III und IV) einer reduzierten und oxydierten Hämoglobinlösung (vgl. Tabelle 21).

Hämoglobinlösungen oder Blut; man hat dieses Verhalten in der Weise erklärt, dass Hämoglobin stark sauer sei; es ist eigentümlich, dass dieses Phänomen und diese den Puffergesetzen widersprechende Auslegung nicht längst zur Entdeckung des Carbhämoglobins geführt haben. Der Nachweis des Carbhämoglobins löst sofort das Rätsel.

VII. Einige physiologische Bemerkungen.

Wie schon hervorgehoben, liegt es ausser dem Plan der vorliegenden Arbeit auf rein physiologische Probleme tiefer einzugehen; ich behalte es mir vor, in einem späteren Aufsatz hierauf zurückzukommen. Dieses Kapitel mag deshalb nur als vorläufige Betrachtung aufgefasst werden.

In der V. vorläufigen Mitteilung sind folgende Gedanken ausgesprochen worden:

Während es mir gelungen ist zu zeigen, dass Carbhämoglobin CO_2 mit grosser Geschwindigkeit abgeben kann, ist es mir noch nicht gelungen, eine Technik auszuarbeiten, mit der sich quantitativ demonstrieren lässt, das Hämoglobin CO_2 mit grosser Geschwindigkeit aufnehmen kann. Qualitativ kann man bei Versuchen in einem gewöhnlichen Saturator zeigen, dass eine Hämoglobinlösung schnell verhältnismässig mehr CO_2 als Serum aufnimmt; genauere Zahlen habe ich nicht erreicht. Im folgenden wird vorausgesetzt, dass das Hämoglobin schnell CO_2 aus den Geweben aufnehmen kann.

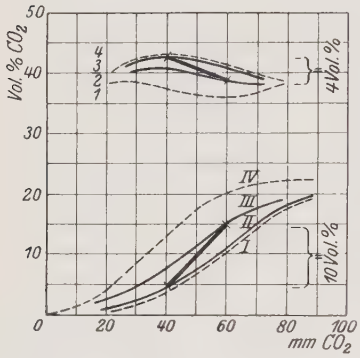

Abb. 43. Komplexgebundenes CO_2 und Bicarbonat einer reduzierten und oxydierten Hämoglobinlösung unter physiologischen Verhältnissen.

In Abb. 43 stellen die gestrichelten Kurven die Komplexbindungs- und Bicarbonatkurven der Abb. 42 dar; diese gelten für total reduziertes und total oxydiertes Hämoglobin; unter physiologischen Verhältnissen ist das Venenblut etwa 54% und das Arterienblut etwa 92% mit O_2 gesättigt; die voll ausgezogenen Kurven geben dieses wieder. Während der Passage durch die Capillaren geht das Blut von der einen auf die andere Oxydationsstufe und wechselt gleichzeitig zwischen den CO_2-Gleichgewichtsdrucken von 60 und von 40 mm Hg; dieses ist durch die fett aufgezogene, schräge Verbindungslinie zwischen den Komplexbindungskurven ausgedrückt; diesen entlang geht der schnelle CO_2-Wechsel vor sich, aufwärts in den Gewebscapillaren, abwärts in den Lungencapillaren. Die Kurve zeigt, dass etwa 10 Vol.-% CO_2 in dieser Weise durch eine 21%ige Hämoglobinlösung umgesetzt werden kann; dieses genügt völlig physiologischen Ansprüchen.

Im Kreislauf wird das gelöste CO_2 gleichzeitig mit dem komplex gebundenen ausgewechselt.

Wie verhält sich aber das Bicarbonatsystem während der inneren Respiration?

Kommt es überhaupt jemals zu einem Gleichgewicht mit dem physikalisch gelösten CO_2 während des Kreislaufes des Blutes von den Geweben zu den Lungen und von den Lungen zu den Geweben?

Aus den Bicarbonatkurven der Abb. 43 ist ersichtlich, dass bei 60 mm CO_2 und 54% Oxydierung 4 Vol.-% weniger Bicarbonat-CO_2 in der Hämoglobinlösung ist als bei 40 mm CO_2 und 92% Oxydierung. Es ist schon im vorigen Kapitel hervorgehoben, dass diese absolute Unterbilanz vielleicht auf mangelhafter Technik beruht, dass es aber als sicher zu betrachten ist, dass eine relative Unterbilanz von Bicarbonat vorhanden sein muss.

Wie wird der Ablauf bzw. die Deckung für diese Über-Unterbilanz im zirkulierenden Blute geschaffen?

Seit dem vorigen Jahrhundert hat man gewusst, dass Bicarbonat(ionen) aus den Erythrocyten zum Serum bei steigenden CO_2-Drucken [Zuntz, (1867)] und gleichzeitig Chlor(ionen) aus dem Serum in die Erythrocyten [Nasse (1874)] passieren; die umgekehrten Prozesse finden bei Verkleinerung des CO_2-Druckes statt.

Diese Frage ist während der letzten zwanzig Jahre eifrig studiert; Spiro und Henderson (1908) waren die ersten, die diese Wanderungen als einfache physikalisch-chemische Gleichgewichtseinstellungen zu beiden Seiten der supponierten Erythrocytenmembran auffassten. van Slyke und Cullen (1917), Fridericia (1920), van Slyke, Murray, Hastings und Sendroy (1925) ausser vielen anderen haben die Wanderungen experimentell untersucht und beinahe äquivalenten Austausch gefunden.

Der Grössenordnung nach stimmen die Literaturangaben über den Bicarbonattransport bei variierten CO_2-Drucken gut mit der von mir nachgewiesenen Über-Unterbilanz von Bicarbonat in Hämoglobinlösungen überein; mehr ist kaum zu verlangen hinsichtlich der Unterschiede der Versuchsbedingungen.

Die Frage ist die, ob die Diffusion von Bicarbonat- und Chlorionen so schnell ist, dass sie sich abspielen kann, bevor die Hydratisierung von CO_2 und die Anhydrierung von Kohlensäure in nennenswertem Grade stattfindet. Und dieses muss der Fall sein, da man tatsächlich im Serum des venösen Blutes den Überschuss, und im Serum des arteriellen Blutes die Unterbilanz des Bicarbonats nachweisen kann. Es soll hier daran erinnert sein, dass Ege (1922) gezeigt hat, dass Bicarbonat- und Chlorionen viel schneller als andere Ionen in die Erythrocyten diffundieren, z. B. etwa 30 mal schneller als Sulfationen.

Ferner hat Krogh (1910) bewiesen, dass Arterienblut in CO_2-Gleichgewicht mit der Alveolenluft steht, das heisst, dass der CO_2-Wechsel in den Lungencapillaren im Laufe etwa einer Sekunde bis zum Gleichgewicht gediehen ist, der Zeit, die das Blut durchschnittlich zur Capillarpassage braucht. Wie schon vorgehoben, zeigen die referierten Versuche, dass eine bestimmte Verteilung von „Bicarbonat" und Chlor zwischen dem Serum oder Plasma einerseits und den Erythrocyten anderseits jedem CO_2-Druck entspricht. Also müssen die Diffusionen sich im Laufe derselben Sekunde abgespielt haben.

Wären die Diffusionsgeschwindigkeiten der Ionen nicht so gross, so würde dies bedeuten, dass während des Kreislaufes

1. In den Arterien eine ständige Kohlensäureanhydrierung im Plasma und CO_2-Hydratisierung in den Erythrocyten, sowie

2. in den Venen eine ständige CO_2-Hydratisierung im Plasma und Kohlensäureanhydrierung in den Erythrocyten stattfindet.

Dieses ist nicht wahrscheinlich und lässt sich also auch nicht mit Kroghs Versuch in Einklang bringen.

Es muss daher berechtigt sein, den Schluss zu ziehen:

Im Blute geht der Austausch des chemisch gebundenen CO_2 ausschliesslich mittels des Carbhämoglobins vor sich; das Bicarbonat (HCO'_3) und die Kohlensäure (H_2CO_3) spielen dieselbe untergeordnete Rolle für die Respiration wie die Chlorionen.

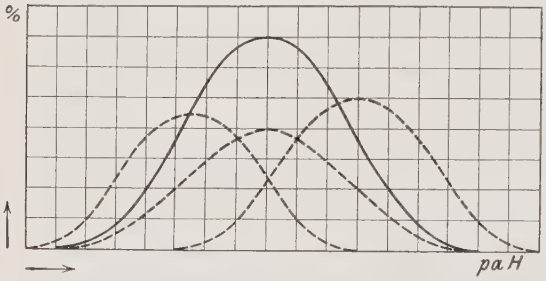

Abb. 44. Zu erwartende CO_2-Komplexbindungsprozente in Hämoglobinlösungen bei variierten Salzkonzentrationen.

Man hat sich vorgestellt [Rona und György (1913)] und namentlich Warburg (1922), dass die Ionenverteilung durch einen Donnan-Prozess zu beiden Seiten der hypothetischen Erythrocytenmembran in der Weise geregelt würde, dass die gesamten osmotischen Konzentrationen auf den zwei Seiten durch einen beliebigen Anionenaustausch auf ihre gehörigen Höhen eingestellt würden. Das ist aber kaum richtig, denn Donnans Gesetz verlangt für jede monovalente, diffusible Anionenart dieselbe proportionale Verteilung und für jede monovalente, diffusible Kationenart dieselbe proportionale aber reziproke Verteilung, also

$$\frac{a[Cl']_1}{a[Cl']_2} = \frac{a[HCO'_3]_1}{a[HCO'_3]_2} = \frac{a[H^+]_2}{a[H^+]_1}.$$

Im Blute aber diffundieren die monovalenten Anionen $[HCO'_3]$ und $[Cl']$ einander kompensierend entgegen; und diese Ionendiffusionen können deshalb nicht durch einen einfachen Donnan-Vorgang erklärt werden.

Die nachgewiesenen, mit dem CO_2-Druck in verschiedenen Weisen variierenden Komplexbindungen von CO_2 und Chlor geben uns die erste plausible Erklärung dieser Ionenwanderungen; eine quantitative Auswertung kann selbstverständlich erst dann unternommen werden, wenn das notwendige Versuchsmaterial vorliegt.

Nach Faurholts (1925) Versuchen über die Verteilung des gebundenen CO_2 zwischen Carbaminsystem und Carbonatsystem in Lösungen von CO_2

und Aminen müssen wir Verteilungskurven für eine Hämoglobin-CO_2-Lösung erwarten, die etwa den Verlauf der voll ausgezogenen Kurve in Abb. 44 haben.

Ändern wir jetzt die Konzentrationen (oder korrekter die Aktivitäten) der Komponenten der Lösung durch Diffusion von Ionen und/oder Wasser oder durch Gasaustausch, dann müssen wir eine Verschiebung der Kurve erwarten, z. B. zu einem Verlauf wie einer der gestrichelten Kurven. Wir müssen also einen grossen Einfluss von Salz-Konzentrationsänderungen auf die CO_2-Komplexbindungsfähigkeit des Hämoglobins erwarten und daher auf die respiratorische Leistungsfähigkeit des Blutes. Meine Donnan-Versuche haben diese Vermutung bestätigt (siehe die Abb. 45, 46 und 47). Diese Andeutungen müssen genügen, bis ein genaues Versuchsmaterial vorliegt.

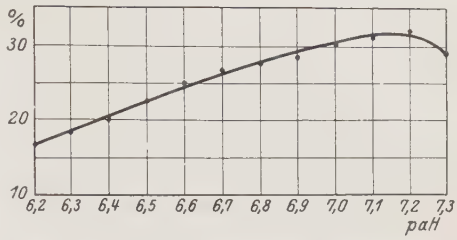

Abb. 45. Die CO_2-Komplexbindungsprozente in meiner 1. Donnan-Versuchsreihe $\left(= \frac{\text{mM [Komplex-CO}_2\text{]}}{\text{mM [Total-CO}_2\text{]}} \times 100\right)$.

Aus den Versuchen von Barcroft und Camis (s. Abb. 5 und 6) wissen wir, dass Änderungen der Salzkonzentrationen einen sehr grossen Einfluss auf die Sauerstoffabgabe des Oxyhämoglobins ausüben.

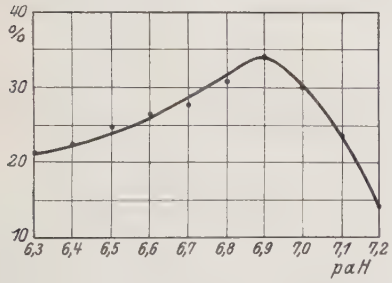

Abb. 46. Die CO_2-Komplexbindungsprozente in meiner 2. Donnan-Versuchsreihe $\left(= \frac{\text{mM [Komplex-CO}_2\text{]}}{\text{mM [Total-CO}_2\text{]}} \times 100\right)$.

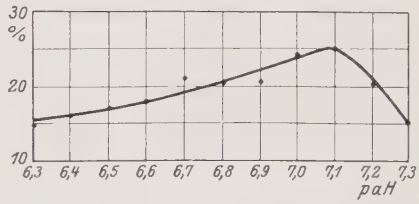

Abb. 47. Die CO_2-Komplexbindungsprozente in meiner 3. Donnan-Versuchsreihe $\left(= \frac{\text{mM [Komplex-CO}_2\text{]}}{\text{mM [Total-CO}_2\text{]}} \times 100\right)$.

Variationen des Salzgehaltes des Blutes sind somit Vorgänge, durch welche der Organismus die respiratorische Fähigkeit des Blutes regulieren kann; und diese Variationen können sehr schnell einsetzen; auf forcierte Alveolendurchlüftung, auf Ätherinhalation oder auf Morphiuminjektionen z. B. folgen sofort Änderungen des Bicarbonatgehaltes des Blutes (siehe z. B. Yandell Henderson 1917); wie sich die Kationen- und Chlorkonzentrationen des Blutes bei diesen Prozessen verhalten, ist meines Wissens niemals untersucht.

Der Nachweis des Carbhämoglobins stellt diese seit langem bekannten, plötzlichen Änderungen der Bicarbonatkonzentration des Blutes in eine neue Beleuchtung. Wir wissen jetzt, dass das Bicarbonat nichts mit dem „respira-

torischen CO_2" zu tun hat, und die Wirkung der Konzentrationsänderung dieses Ions auf den respiratorischen Gaswechsel ist also keine direkte.

Ein Organismus ist imstande, schnell und binnen weiten Grenzen seinen respiratorischen Stoffwechsel nach dem Bedarf zu regulieren; man kann die Mechanismen, die der Organismus für diese Variationen benutzt, in zwei Klassen einteilen:

1. Die Änderungen ausserhalb des Blutes (Blutdruck, Minutenvolumen, Schlagvolumen, Puls, Herzfrequenz, Atemfrequenz, Atemgrösse, Capillarregulierung, Milzregulierung usw.).

2. Die Änderungen innerhalb des Blutes; von diesen sind nur die spät einsetzenden Änderungen der Hämoglobinkonzentration (Bergbesteiger, Tunnelarbeiter) und die schnell einsetzenden Änderungen der Bicarbonatkonzentrationen näher untersucht.

Da die Bicarbonat- und Chlorkonzentrationen im Blute gewissermassen einander äquilibrieren, und da die Kationenkonzentrationen beteiligt sein müssen, wäre es von grossem Interesse, diese Konzentrationsänderungen ausführlich zu studieren, sowie die hierbei eintretenden Änderungen der respiratorischen Leistungsfähigkeit des Blutes.

Wir werden in einer späteren Arbeit auf diesen intrasanguinen Regulierungsmechanismus des respiratorischen Stoffwechsels zurückkommen.

VIII. Zusammenfassung.

1. Einleitung. Die bisherigen Grundanschauungen über die Zustandsform des CO_2 im Blute sind kurz auseinandergesetzt: es wurde angenommen, 1. dass CO_2 nur als gelöstes CO_2, hydratisiertes CO_2 (H_2CO_3) und Bicarbonat (HCO'_3) im Blute existiere, 2. dass daher das einfache Massenwirkungsgesetz für die Dissoziation des CO_2 im Blute gültig sei, 3. dass der CO_2-Wechsel in und aus dem Blut sich durch Hydratisierung von CO_2 bzw. Anhydrierung von Kohlensäure abspiele, und 4. dass die Ionenverteilung zwischen Erythrocyten und Plasma durch einfache physikalisch-chemische Gleichgewichtseinstellungen vor sich gehe.

Aus Faurholts Versuchen werden die Geschwindigkeiten berechnet, mit welchen CO_2-Bicarbonat-Lösungen bei physiologischen Wasserstoffionenaktivitäten und verschiedenen Temperaturen das Gleichgewicht erreichen können. Es wurde gezeigt, dass das CO_2-Bicarbonat-System im Blute unmöglich zum Gleichgewicht binnen einer Sekunde kommen kann, der Zeit, die das Blut zur Capillarpassage braucht. Bei 0°, 18° und 37° C können nur bzw. 0,4%, 3% und 16% der Kohlensäurekomponente sich umsetzen. Die Problemstellung, zu welcher dieser Nachweis dem Verfasser Anlass gegeben hat, wurde besprochen, sowie der Plan vorliegender Arbeit.

2. Aus einigen Betrachtungen über die allgemeine physikalische Chemie der Eiweissstoffe im Lichte der Bjerrumschen Ampholyttheorie wird ersichtlich, dass Komplexbindung von Ionen (oder einem Gas wie O_2) an Eiweissmolekel unter gleichzeitiger elektrischer Umladung der Eiweissmolekel ein allgemeiner Vorgang ist; die vom Verfasser nachgewiesene Komplexbindung von CO_2 an Hämoglobin, die unter Elektronegativierung der Hämoglobinmolekel verläuft, ist daher nur als ein Spezialfall anzusehen.

3. „Über die Dissoziation des CO_2". Die Dissoziationsgesetze des CO_2 in wässerigen Lösungen wurden einer Erörterung unterzogen. Es konnte gezeigt werden, dass die Messungen der „1. Dissoziationskonstante des CO_2" in Hämoglobinlösungen von Stadie und Hawes (1928) nur als eine Bestätigung meines Nachweises der Komplexbindung von CO_2 und Chlor an das Hämoglobin aufgefasst werden kann.

4. Ein kurzer historischer Rückblick auf die Arbeiten über die physikalische Chemie des Hämoglobins der letzten 30 Jahre ist gegeben.

5. In drei Donnan-Versuchsreihen mit CO_2-Cl'-Hämoglobinlösungen und einer mit Phosphat-Hämoglobinlösungen wird eine mit der Wasserstoffionenaktivität variierende Komplexbindung von CO_2, sowie von Chlor- und Phosphationen nachgewiesen.

6. Eine Reihe von „Explosionsanalysen" mit drei verschiedenen Seris und mehreren verschiedenen Hämoglobinlösungen, die bei variierten CO_2-Drucken gesättigt waren, zeigt, dass Hämoglobinlösungen, nicht aber Sera, einen Teil ihres gegenwärtigen, gebundenen CO_2 „momentan" abgeben können, wenn sie plötzlich einem Torricelli-Vakuum ausgesetzt werden, während sie den Rest nur langsam abgeben, ganz wie Sera ihr gebundenes CO_2 nur langsam abgeben. Es wird betont, dass das schnell reagierende CO_2 in CO_2-Hämoglobinlösungen aller Wahrscheinlichkeit nach komplex an das Hämoglobin gebunden ist, — also als Carbhämoglobin.

7. a) Im Blute geht der Austausch des chemisch gebundenen CO_2 ausschliesslich mittels des Carbhämoglobins vor sich; das Bicarbonat (HCO'_3) und die Kohlensäure (H_2CO_3) spielen dieselbe untergeordnete Rolle für die Respiration wie die Chlorionen. Während der Capillarpassage kommt das Bicarbonat- und Chlorionensystem zum Gleichgewicht durch die Diffusion der Ionen zwischen dem Plasma und den Erythrocyten.

b) Da 1. die Salzkonzentrationen im Plasma und in den Erythrocyten einen sehr grossen Einfluss auf die Sauerstoff- und CO_2-Auswechselfähigkeit des Hämoglobins ausüben, und da 2. wir aus vielen Versuchen aus der Literatur wissen, dass Bicarbonat schnell aus dem Blut bei beschleunigter Respiration verschwindet und schnell in das Blut bei verlangsamter Respiration hineinkommt, können wir folgendes schliessen, dass:

Der Organismus ist mit einem schnell einsetzenden, physikalisch-chemischen, im Blute gelegenen Regulierungsmechanismus seines respiratorischen Stoffwechsels ausgestattet, der die respiratorische Leistungsfähigkeit des Hämoglobins nach dem augenblicklichen Bedarf einstellt.

Es ist mir eine angenehme Pflicht meinem lieben und hochverehrten Lehrer, dem Direktor des Institutes, Dr. Thorvald Madsen, meinen herzlichsten Dank für sein freundliches und anregendes Interesse sowie für die ausgezeichneten Arbeitsverhältnisse im Laboratorium auszusprechen.

Literaturverzeichnis.

Adair, G. S., J. of Physiol. **58**, 35 u. 39 (1924); und Proc. roy. Soc. Lond. Ser. A **108**, 627 (1925) u. **109**, 292 (1925). — *Atchley* u. *Nichols*, J. of biol. Chem. **65**, 729 (1925).

Barcroft, J., The Respiratory Function of Blood, Cambridge 1914. — *Derselbe* u. *Burn*, J. of Physiol. **45**, 493 (1912). — *Derselbe* u. *Camis*, J. of Physiol. **39**, 118 (1909). — *Derselbe* u. *Hill*, J. of Physiol. **39**, 411; Biochemic. J. I: **7**, 471 (1913); II: 481. — *Derselbe* u. *King*, J. of Physiol. **39**, 374 (1909). — *Derselbe* u. *Means*, J. of Physiol. **47**, 12—13 (1913). — *Derselbe* u. *Orbelli*, J. of Physiol. **41**, 355 (1910). — *Derselbe* u. *Roberts*, J. of Physiol. **39**, 143 (1909). — *Biilmann*, Köbenhavns Universitets Festskrift **1920**. — *Derselbe* u. *Henriques*, Bibl. Laeg. (dän.) **1924**, 569. — *Bjerrum*, Z. physik. Chem. **104**, 147 u. **106**, 219 (1923). — *Bohr*, Skand. Arch. Physiol. (Berl. u. Lpz.) **3**, 47 (1892) u. **17**, 104 (1905); Zbl. Physiol. **17**, 688 (1904). (Zit. nach Bohr in Nagels Handbuch.); Nagels Handbuch der Physiologie des Menschen. **1**, 54 (1909). — *Derselbe* u. *Bock*, (1894). Zit. nach Landolt-Börnsteins Tabb. — *Derselbe, Hasselbach* u. *Krogh*, Skand. Arch. Physiol. (Berl. u. Lpz.) **16**, 402 (1904). — *Brönsted, J. N.*, Rec. Trav. chim. Pays-Bas **62**, 718 (1923). — *Brown* u. *Hill*, Proc. roy. Soc. Lond. Ser. B. **94**, 297 (1923).

Christiansen, Douglas u. *Haldane*, J. of Physiol. **47** (1913) II u. **48**, 244 (1914).

Donnan, Z. Elektrochem. **17**, 573 (1911). — *Douglas, Haldane* u. *Haldane*, J. of Physiol. **44**, 275 (1912).

Ege, Disputats, Köbenhavn, **1919**; u. Biochem. Z. **130**, 116 (1922).

Faurholt, Disputats. Köbenhavn **1924**. (Deutsches Résumé). — *Derselbe*, J. Chim. physique **21**, 400 (1924); **22**, 1 (1925). — *Fridericia*, J. of biol. Chem. **42**, 245 (1920).

Geffcken, Z. physik. Chem. **69**, 257 (1904). — *Gram* u. *Cullen*, J. biol. Chem. **57**, 477 (1923).

Haldane u. *Smith*, J. of Physiol. **22**, 35 (1897). — *Hammarsten*, Lehrbuch der physiologischen Chemie **1914**. — *Hardy*, Proc. roy. Soc. **66**, 110 (1900); J. of Physiol. **29**, 29 (1903) u. **33**, 251 (1905). — *Hartridge* u. *Roughton*, Proc. roy. Soc. A. **104**, 376 (1923), 395 u. **107**, 654 (1925); Proc. Cambridge philos. Soc. **22**, 3, 426 (1924) u. **23**, 4, 450 (1926); J. of Physiol. **62**, 233 (1927). — *Hasselbalch*, Biochem. Z. **30**, 317 (1911); **74**, 56 (1916); **78**, 112 (1916) u. **82**, 282 (1917). — *Derselbe* u. *Warburg*, Biochem. Z. **86**, 410 (1918). — *Hastings* u. *Sendroy*, J. biol. Chem. **65**, 445 (1925). — *Heidelberger*, J. biol. Chem. **53**, 31 (1922). — *Henderson, J. L.*, Amer. J. Physiol. **21**, 427 (1908); Erg. Physiol. **1909**, 254; J. biol. Chem. **41**, 401 (1920); **46**, 411 (1921); **59**, 379 (1924) u. **65**, 407 (1925). — *Derselbe* u. *Spiro*, Biochem. Z. **15**, 105 u. 114 (1908). — *Henderson, Yandell* u. *H. W. Haggard*, J. biol. Chem. **23**, 333 u. 345 (1917). — *Hill*, J. of Physiol. **40** (1910) IV; Biochem. J. **15** 577 (1921); J. biol. Chem. **51**, 359 (1922) u. J. gen. Physiol. **6**, 91 (1924). — *Hofmeister*, Arch. f. exper. Path. **24**, 247 (1888); **25**, 1 (1889); **27**, 395 (1890) u. **28**, 210 (1891). — *Hüfner*, Arch. Anat. u. Physiol. **1901**, Suppl., 187. — *Derselbe* u. *Gansser*, Arch. Anat. u. Physiol. **1907**, Suppl., 209.

Joffe u. *Poulton*, J. of Physiol. **54**, 129 (1920).

Kohlrausch, Lehrbuch der praktischen Physik, 13. Aufl. Leipzig-Berlin 1921. — *Krogh, A.*, Skand. Arch. Physiol. (Berl. u. Lpz.) **16**, 390 (1904). — *Derselbe* u. *M. Krogh*, **23**, 179 (1910). — *Kunitz*, J. gen. Physiol. **6**, 413 u. 547 (1924).

Lewis u. *Randall*, Thermodynamics. New York 1923. — *Linderström-Lang* u. *Lund*, Medd. Carlsberg Labor. (dän.) **16**, Nr 5 (1926). — *Loeb*, Univ. California Publ., Physiol. **7**, 149 (1904). (Zit. nach Loebs Buch.) — *Derselbe*, Proteins and the Theory of Colloidal Behaviour. New York **1922**. — *Derselbe*, J. biol. Chem. **31**, 343 (1917); **33**, 531 (1918); J. gen. Physiol. **2**, 87, 173, 255, 273, 387, 563, 577, 659 u. 673 (1920); **3**, 85, 247, 391, 548, 557, 667, 691 u. 877 (1921); **4**, 73, 97, 187, 213, 351, 463, 617, 621, 741, 759 u. 769 (1922); **5**, 89, 109, 231, 255, 395, 479 u. 505 (1923); **6**, 105, 215 u. 307 (1924). — *Derselbe* u. *Kunitz*, J. gen. Physiol, **5**, 665, 695 (1923) u. **6**, 479 (1924).

Mellanby, J. of Physiol. **33**, 338 (1905). — *Michaelis*, Biochem. Z. **19**, 181 (1909); **103**, 225 (1920) u. **106**, 82 (1920). — *Derselbe*, Wasserstoffionenkonzentration. Berlin 1914 u. **1** (1922). — *Derselbe*, Praktikum der physikalischen Chemie. Berlin 1921. — *Derselbe* u. *Airila*, Biochem. Z. **118**, 144 (1921). — *Derselbe* u. *Davidoff*, Biochem. Z. **46**, 131 (1912). — *Derselbe* u. *Davidsohn*, Biochem. Z. **41**, 102 (1912). — *Derselbe* u. *Rona*, Biochem. Z. **18**, 317 (1909) u. **94**, 224 (1919). — *Derselbe* u. *v. Szent-Györgyi*, Biochem. Z. **103**, 178 (1920). — *Derselbe* u. *Takahashi*, Biochem. Z. **29**, 439 (1910). — *Milroy*, J. of Physiol. **51**, 259 (1917).

Nasse, Pflügers Arch. **16**, 604 (1878). — *Northrop*, J. gen. Physiol. **4**, 629 (1922). — *Derselbe* u. *Kunitz*, J. gen. Physiol. **7**, 25 (1924) u. **9**, 351 (1926).

Ostwald, W., (1908). Zit. nach Barcrofts Buch.

Palmer, Atchley u. *Loeb*, J. gen. Physiol. **3**, 801 (1921). — *Pauli*, Biochem. Z. **152**, 355 (1924). — *Derselbe* u. *Adolf*, Biochem. Z. **152**, 360 (1924). — *Derselbe, Frisch* u. *Valkó*, Biochem. Z. **164**, 401 (1925). — *Derselbe* u. *Modern*, Biochem. Z. **156**, 482 (1925). — *Derselbe* u. *Schön*, Biochem. Z. **153**, 253 (1924). — *Peters*, J. of Physiol. **44**, 131 (1912). — *Polányi*, Biochem. Z. **104**, 237 (1920).

Reichert u. *Brown*, Publ. **116** (1909). Carnegie Inst. Wash. 324, zit. nach Brown u. Hill. — *Reid*, J. of Physiol. **33**, 12 (1905). — *Roaf*, J. of Physiol. **38**, 1 (1909). — *Rona* u. *György*, Biochem. Z. **56**, 417 (1913). — *Rördam*, Studies on Activities. Diss. Köbenhavn 1925.

Stadie, J. biol. Chem. **77**, 303 (1928). — *Derselbe* u. *Hawes*, J. biol. Chem. **77**, 265 (1928). — *Sörensen, S. P. L.*, Proteinstudier. Medd. Carlsberg Labor. (dän.) **1917**. — *Derselbe* u. *Palitzsch*, Medd. Carlsberg Labor. (dän.)**15**, Nr 2 (1923). — *Svedberg* u. *Fåhraeus*, J. amer. chem. Soc. **48**, 330 (1926). — *Derselbe* u. *Nichols*, J. amer. chem. Soc. **45**, 2910 (1923).

Troensegaard, Z. angew. Chem. **38**, 623 (1925).

van Slyke, J. biol. Chem. **30**, 347; **33**, 127 (1917); **48**, 153 (1921); Physiologic Rev. **1** 141 (1921); J. biol. Chem. **52**, 495 u. 524 (1922). — *Derselbe* u. *Austin*, J. biol. Chem. **41**, 245 u. **45**, 461 (1920). — *Derselbe, Austin, Cullen, Hastings, McLean* u. *Peters*, J. biol. Chem. **54**, 121 (1922). — *Derselbe, Austin, Cullen* u. *Peters*, J. biol. Chem. **54**, 149 (1922). — *Derselbe* u. *Cullen*, J. biol. Chem. **30**, 289 (1917). — *Derselbe, Hastings, Heidelberger* u. *Neil*, J. biol. Chem. **54**, 481 (1922). — *Derselbe, Hastings* u. *Neil*, J. biol. Chem. **54** 507 (1922). — *Derselbe, Hastings, Neil, Heidelberger* u. *Harrington*, J. biol. Chem. **60** 89 (1924). — *Derselbe, Hastings, Sendroy, Murray* u. *Heidelberger*, J. biol. Chem. **61**, 317 (1924). — *Derselbe, McLean* u. *Wu*, J. biol. Chem. **56**, 765 (1923). — *Derselbe, Murray, Hastings* u. *Sendroy*, J. biol. Chem. **65**, 70 (1925). — *Derselbe* u. *Palmer*, J. biol. Chem. **32**, 499 (1917). — *Derselbe* u. *Stadie*, J. biol. Chem. **41**, 191 (1920); u. **49**, 1 (1921). — *Derselbe, Stillmann* u. *Cullen*, J. biol. Chem. **30**, 401 (1917); u. **38**, 167 (1919).

Warburg, Biochemic. J. **16**, 153 (1922).

Zuntz, Zbl. med. Wiss. **1867**, 529.